

UNTERSUCHUNGEN ZUM MECHANISMUS
VON OPIOIDTOLERANZ UND -ABHÄNGIGKEIT
AM PLEXUS MYENTERICUS DES MEERSCHWEINCHENILEUMS
MIT ERGÄNZENDEN BINDUNGSSTUDIEN AM RATTENHIRN

EVA SEIDL

Diss
München
1985



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Untersuchungen zum Mechanismus
von Opioidtoleranz und -abhängigkeit
am Plexus myentericus des Meerschweinchenileums
mit ergänzenden Bindungsstudien am Rattenhirn

Dissertation
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Eva Seidl
München
Oktober 1985

1. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Herz
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.1985

<u>Zusammenfassung</u>	4
<u>1. Einleitung</u>	7
1.1. Opioidforschung - Überblick	7
1.1.1. Natürliche und synthetische Opioid-alkaloide	7
1.1.2. Opioidrezeptoren	8
1.1.3. Multiple Opioidrezeptoren	9
1.1.4. Opioidpeptide	11
1.2 Opioidtoleranz und -abhängigkeit	12
1.2.1. Begriffserklärungen	12
1.2.2. Theorien zum Mechanismus von Toleranz und Abhängigkeit	14
1.2.2.1. Änderung der neuronalen Empfindlichkeit	15
1.2.2.2. Die Enzymexpansionstheorie	17
1.3. Problemstellung	19
<u>2. Ergebnisse</u>	23
2.1. Opioidtoleranz und -abhängigkeit am Längsmuskelpräparat des isolierten Meerschweinchenileums	23
2.1.1. Das isolierte Meerschweinchenileum	23
2.1.1.1. Anatomischer Aufbau	23
2.1.1.2. Akute Opioidwirkungen	24
2.1.1.3. Wirkungen von Neurotransmittern und spasmogenen Substanzen	25
2.1.1.4. Chronische Opioidwirkungen	26
2.1.2. Untersuchungen zur Opioidabhängigkeit an Präparaten mit intakten Opioidrezeptoren	28
2.1.2.1. Vorbemerkungen	28
2.1.2.2. Versuchsschema	33

2.1.2.3. Versuchsbedingungen	34
2.1.2.4. Ergebnis	39
2.1.3. Untersuchungen zur Opioidabhängigkeit nach selektiver Blockade von spezifi- schen Opioidrezeptoren	43
2.1.3.1. Vorbemerkungen	43
2.1.3.2. Versuchsschema (β -FNA)	47
2.1.3.3. Versuchsbedingungen (β -FNA)	49
2.1.3.4. Ergebnis (β -FNA)	54
2.1.3.5. Versuche mit β -CNA	58
2.1.4. In-vivo-Infusion von Opioiden	65
2.1.4.1. Vorbemerkungen	65
2.1.4.2. Fentanylserumgehalt nach niedrig- und hochdosierter Fentanylinfusion	66
2.1.4.3. Intensität der (Kreuz-)Abhän- gigkeitsentwicklung nach nied- rig- bzw. hochdosierter Opi- oidinfusion	67
2.1.5. Die Beziehung zwischen Tole- ranz- und Abhängigkeitsent- wicklung	69
2.2. Bindungseigenschaften von Opioidrezeptoren im Rattenhirn nach chronischer Opioidexposition	72
2.2.1. Vorbemerkungen	72
2.2.2. Ergebnis	77
<u>3. Diskussion</u>	79
<u>4. Experimenteller Teil</u>	91
4.1. Materialien und Substanzen	91
4.2. Geräte und Hilfsmittel	92
4.2.1. Längsmuskelpräparat	92
4.2.2. Radiorezeptorassay	93

	Seite
4.2.3. Radioimmunoassay	93
4.2.4. Sonstiges	93
4.3. Tiere	94
4.4. Methoden	95
4.4.1. Längsmuskelpräparat des isolierten Meerschweinchenileums	95
4.4.1.1. Chronische Opioidinfusion	95
4.4.1.2. Präparation des Längsmuskels	97
4.4.1.3. Versuchsanordnung	98
4.4.1.4. Quantifizierung der Opioid- wirkung	99
4.4.1.5. Demonstration und Quantifi- zierung der Abhängigkeit	100
4.4.1.6. Bestimmung des K_e -Wertes	101
4.4.2. Radiorezeptorassay am Rattenhirn	102
4.4.2.1. Chronische Morphinexposition	102
4.4.2.2. Analyse nach Scatchard	103
4.4.3. Radioimmunoassay	104
4.4.3.1. Titerbestimmung des Antifen- tanylantiserums	104
4.4.3.2. Standardkurve für Fentanyl	106
4.5. Statistik	107
4.6. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	108
 <u>5. Literaturverzeichnis</u>	 110
 Lebenslauf	 129

Zusammenfassung

Chronische Exposition von Nervenzellen mit Opioiden führt zur Entwicklung von Toleranz und Abhängigkeit. Eine Erklärung für diese Beobachtung wurde durch Theorien versucht, die für beide Phänomene einen gemeinsamen biochemischen Mechanismus postulieren ("unitary theory"). Neuere Erkenntnisse auf dem Gebiet der Opioidforschung gaben Anlaß zu Überlegungen, ob die "unitary theory" tatsächlich ein allgemein gültiges Prinzip der adaptiven Veränderungen während chronischer Opioidrezeptoraktivierung darstellt. Die vorliegende Arbeit untersuchte daher pharmakologische Parameter von Opioidtoleranz und -abhängigkeit im Plexus myentericus des Meerschweinchenileums, einem klassischen Präparat zum Studium der Wirkungsweise von Opioiden. Unter Berücksichtigung des Konzeptes der multiplen Opioidrezeptoren wurde der Frage einer möglichen Dissoziation dieser Phänomene nachgegangen.

Der in der Literatur beschriebene Befund der "selektiven Toleranz", d.h. der Koexistenz normal empfindlicher und hochtoleranter Opioidrezeptoren, warf die Frage auf, ob jene Opioidrezeptoren, die "selektive Toleranz" entwickelt haben, auch "selektiv abhängig" sind. Diese Problematik läßt sich am isolierten Meerschweinchenileum bevorzugt studieren. Der Plexus myentericus dieses Präparats enthält funktionelle μ - und κ -Opioidrezeptoren und entwickelt infolge chronischer Opioidexposition sowohl Toleranz als auch Abhängigkeit. Darüberhinaus wurde am Hirnhomogenat chronisch mit Morphin behandelte Ratten untersucht, ob Veränderungen auf der Opioidrezeptorbindungsebene bei der Toleranzentstehung eine Rolle spielen.

Die Demonstration der Abhängigkeit im isolierten Meerschweinchenileum erfolgte durch den Opioidantagonisten

Naloxon, der eine charakteristische Entzugskontraktur des Längsmuskels präzipitiert. Mangels selektiver Opioidantagonisten wurde ein Versuchsschema entwickelt, das die Demonstration der Abhängigkeit einer spezifischen Opioidrezeptorpopulation mit Hilfe eines selektiven Agonisten und des Antagonisten Naloxon ermöglichte. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen dokumentieren, daß "selektive Toleranz" in diesem Präparat nicht mit "selektiver Abhängigkeit" einhergeht. Naloxon präzipitierte an Präparaten mit chronisch aktivierten μ -Rezeptoren auch über eine Interaktion mit κ -Rezeptoren, die nicht chronisch aktiviert wurden, eine intensive Entzugskontraktur. Umgekehrt löste Naloxon an Präparaten mit chronisch aktivierten κ -Rezeptoren auch über "naive" μ -Rezeptoren einen Entzug aus.

Dieser überraschende Befund der "Kreuzabhängigkeit" wurde nach selektiver Blockade der μ -Rezeptoren mit dem alkylierenden Opioidantagonisten β -Funaltrexamin bestätigt.

Die Verabfolgung unterschiedlicher Opioiddosierungen in vivo bewirkte eine unterschiedlich hohe Abhängigkeit. "Kreuzabhängigkeit" zeigte sich bereits bei einem sehr niedrigen Abhängigkeitsgrad.

In Anbetracht der Diskrepanz zwischen Opioidtoleranz- und Abhängigkeitsentwicklung im Plexus myentericus wurde die Korrelation der beiden Phänomene näher untersucht. Es zeigte sich, daß die Entwicklung von Abhängigkeit und Toleranz nicht parallel verläuft. Während die maximalen Entzugssymptome schon bei geringen Toleranzgraden ein Plateau erreichen, ist Toleranz durch eine hohe Steigerungsfähigkeit gekennzeichnet.

Als Erklärung für die Entwicklung hoher Toleranzgrade wurden Veränderungen der Opioidrezeptorbindungseigen-

schaften erwogen. Die Analyse (nach Scatchard) der Bindungsdaten im Hirnhomogenat unbehandelter und chronisch mit Morphin behandelter Ratten lieferte jedoch keinen Hinweis auf Veränderungen von Opioidrezeptorkapazität bzw. -affinität infolge chronischer Morphinexposition.

Die vorliegenden Untersuchungen dokumentieren eine Dissoziation von Opioidtoleranz- und abhängigkeitsentwicklung im Plexus myentericus des Meerschweinchenileums und stellen damit die generelle Gültigkeit des Konzeptes der "unitary theory" in Frage. Der Befund der "Kreuzabhängigkeit" läßt vermuten, daß chronisch aktivierte Opioidrezeptoren mit "naiven" Opioidrezeptoren einen gemeinsamen Effektor kontrollieren, dessen adaptive Veränderungen auch die jeweils nicht chronisch aktivierten Rezeptoren betreffen.

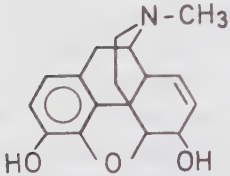
1. Einleitung

1.1. Opioidforschung - Überblick

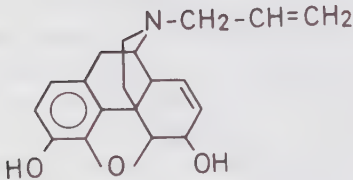
1.1.1. Natürliche und synthetische Opioidalkaloide

Opium, der aus angeschnittenen, unreifen Früchten gewonnene, an der Luft getrocknete Milchsaft des Schlafmohns, findet in der Medizin seit Jahrtausenden Verwendung. Seine schmerzstillende, schlaffördernde und nicht zuletzt seine euphorisierende Wirkung wurde bereits von den Sumerern und im alten Ägypten genutzt (Madden, 1979). Etwa ein Viertel des Opiums besteht aus Alkaloiden, etwa 10% aus Morphin, dem bekanntesten Opiumalkaloid, dessen Isolierung Anfang des 19. Jahrhunderts (1806) dem deutschen Apotheker Sertürner in Paderborn gelang. Nach der Elementaranalyse des Morphins (Laurent, 1847) erfolgte 1925 durch Gulland and Robinson die Strukturaufklärung, die mit der Totalsynthese von Gates und Tschudi (1952) bestätigt wurde. Weitere wichtige Bestandteile des Opiums sind die Phenanthrenederivate Codein und Thebain sowie die Benzyli-sochinoline Papaverin und Narcotin (=Noscapin). Chemische Abwandlung natürlicher Opiumalkaloide und Synthese neuer Stoffe führte zu einer Reihe weiterer morphinartig wirkender Substanzen, so zum Beispiel zu Heroin, dem Diacetylesther des Morphins (Wright, 1874) und den vollsynthetischen Opioiden Pethidin (Eisleb und Schaumann, 1939) und Methadon (Bockmühl und Ehrhardt, 1941). Die Einführung einer Allylgruppe an den Stickstoff von Morphinderivaten hat morphinantagonistische Eigenschaften zur Folge (Pohl, 1915); auf diese Weise entstanden Opioidantagonisten wie Nalorphin (N-Allyl-normorphin, McCawley et al., 1941), das agonistische Teilwirkungen besitzt, und Naloxon (N-Allyloxymorphon,

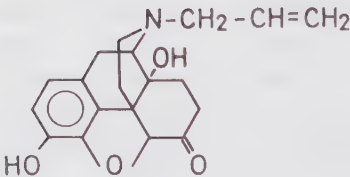
Lewenstein und Fishman, 1966), das einen reinen Opioid-antagonisten darstellt.



Morphin



Nalorphin



Naloxon

Abb.1

1.1.2. Opioidrezeptoren

Opiode besitzen ein charakteristisches Wirkungsspek-

trum. Die opioide Wirkung ist abhängig von der Molekülstruktur, tritt bereits in sehr geringer Konzentration ein, ist stereospezifisch - im allgemeinen für linksdrehende Isomere - und wird durch Opioidantagonisten blockiert. Dies regte zu Überlegungen an, die Aktivität opioider Analgetika und ihrer Antagonisten auf eine Interaktion mit spezifischen Rezeptoren zurückzuführen (Beckett und Casy, 1954; Portoghese, 1965; Smythies, 1975; 1977).

Die Anwendung hochradioaktiv markierter Opiode ermöglichte es schließlich, in den Nervengeweben verschiedener Spezies Opioidrezeptorbindungsstellen zu identifizieren (Pert und Snyder, 1973 a,b; Simon et al., 1973; Terenius, 1973). Untersuchungen ergaben eine gute Korrelation zwischen der Affinität verschiedener Opiode zu ihren stereospezifischen Bindungsstellen und ihrer pharmakologischen Wirkungsstärke (Creese und Snyder, 1975; Pert und Snyder, 1975). Die Verteilung der Opioidrezeptorbindungsstellen in den einzelnen Hirnarealen weist bei Mensch und Rhesusaffe eine Übereinstimmung mit dem Ort der pharmakologischen Opioidwirkung auf (Kuhar et al., 1973).

Die Empfindlichkeit der Opioidbindung gegenüber prote-inmodifizierenden Reagenzien und proteolytischen Enzymen deutete auf den Proteincharakter der Opioidrezeptoren hin (Simon und Hiller, 1978; Snyder, 1975). Mit Hilfe spezieller Detergentien konnten Opioidrezeptormoleküle aus Nervenzellmembranen solubilisiert werden (Koski et al., 1981; Rüegg et al., 1980, 1981; Simonds et al., 1980).

1.1.3. Multiple Opioidrezeptoren

Untersuchungen morphin- und nalorphinartiger Opiode am

spinalisierten Hund (= nach Durchtrennung des Rückenmarks zwischen dem 10. und 11. Brustwirbel; Gilbert und Martin, 1976; Martin et al., 1974;) zeigten ausgeprägte Unterschiede in den pharmakologischen Wirkungsspektren. Nach chronischer Applikation wurden auch hinsichtlich der Entzugssymptomatik deutlich qualitative Unterschiede registriert; die Entzugssymptome morphinabhängiger Hunde konnten durch Benzomorphanderivate wie etwa Cyclazocin nicht unterdrückt werden (Martin et al., 1976). Die Autoren erklärten diese Befunde durch die Interaktion der Opioide mit unterschiedlichen Rezeptortypen und nahmen eine Einteilung in drei charakteristische Gruppen vor: Morphin wurde als prototypischer Agonist des μ -Rezeptors definiert; das Benzomorphanderivat Ketocyclazocin wurde dem κ -Rezeptor und SKF 10,047 (N-Allylnormetazocin) dem σ -Rezeptor zugeordnet.

Das von Martin et al. entworfene Konzept der multiplen Opioidrezeptoren konnte durch pharmakologische Tests an isolierten Organen und durch Bindungsstudien gestützt und erweitert werden (Herz, 1984 b). Am Ductus deferens der Maus wurden μ - und κ -Rezeptoren sowie δ (Enkephalin)-Rezeptoren, am isolierten Meerschweinschenileum μ - und κ -Rezeptoren, aber keine funktionellen δ -Rezeptoren beschrieben (Lord et al., 1977; Schulz et al., 1980 a,b; 1981 b,c; Wüster et al., 1981 a,b). Im Samenleiterpräparat der Ratte, das gegenüber Morphin und den Enkephalinen weitgehend unempfindlich ist, jedoch eine verhältnismäßig starke Reaktion auf β -Endorphin aufweist, wurde die Existenz eines spezifischen Opioidrezeptors des Rattensamenleiters, des ϵ -Rezeptors, postuliert (Schulz et al., 1981 a; Wüster et al., 1979, 1980). Im Gehirn des Meerschweinchens (Kosterlitz et al., 1981; Leslie und Kosterlitz, 1979; Lord et al., 1977) und der Ratte (Chang et al.,

1981; Gillan und Kosterlitz, 1982) wurden ebenfalls multiple Opioidrezeptorpopulationen (μ, κ, δ) nachgewiesen.

Zur Frage nach der Grundlage der Heterogenität der Opioidrezeptoren existieren unterschiedliche Modellvorstellungen. Während von der Mehrzahl der Autoren gefordert wird, daß die verschiedenen Opioidrezeptoren ($\mu, \kappa, \delta, \epsilon, \sigma$) voneinander unabhängige funktionelle Einheiten darstellen, gibt es andererseits den Vorschlag, daß es sich um ein einziges Protein handelt, das in mehreren, ineinander überführbaren Zustandsformen auftritt (Bowen et al., 1981).

1.1.4. Opioidpeptide

Die Identifizierung spezifischer Opioidrezeptoren ließ die Existenz entsprechender Liganden naheliegend erscheinen. Die entscheidende Entdeckung gelang Hughes et al. (1975) mit der Bestimmung der Aminosäuresequenzen zweier Pentapeptide mit opioidähnlicher Wirkung aus Schweinehirn. Die einander sehr ähnlichen Peptide erhielten nach der sie unterscheidenden Aminosäure am C-Terminus die Namen Methionin-Enkephalin (Tyrosin-Glycin-Glycin-Phenylalanin-Methionin) bzw. Leucin-Enkephalin (en kephale = griechisch "im Kopf"). Simantov und Snyder (1976) bestätigten die Hughes' schen Befunde durch Isolierung derselben Peptide aus Kälberhirn. In der Folgezeit wurde eine Reihe weiterer Opioidpeptide identifiziert, wie etwa das aus 31 Aminosäuren bestehende β -Endorphin (Bradbury et al., 1976 a,b; Cox et al., 1976) und das Heptadeka-peptid Dynorphin A (Goldstein et al., 1981), ein endogener Ligand des κ -Rezeptortyps.

Über die Ermittlung der Nukleotidsequenz des korrespondierenden DNA-Moleküls erfolgte die Identifizierung

dreier hochmolekularer Vorläuferpeptide der endogenen Opioidpeptide. Das Proopiomelanocortin (POMC; Nakanishi et al., 1979), der β -Endorphin- und ACTH-Precursor, enthält auch die Sequenzen des Melanophoren stimulierenden Hormons (MSH) und des β -Lipotropins (β -LPH). Im Proenkephalin A, dem Enkephalin-Precursor (Noda et al., 1982), finden sich die Met-Enkephalin- und die Leu-Enkephalin-Sequenz sowie die der Opioidpeptide E und F und der BAM(bovine-adrenal-medulla)-Peptide. Das Proenkephalin B (Prodynorphin; Kadikani et al., 1982), der Dynorphin-Precursor, weist unter anderem die Leu-Enkephalin- und Dynorphin-Sequenzen auf.

Die physiologischen Funktionen der endogenen Opioiden sind noch wenig erforscht (Herz, 1984 a,b). Man vermutet eine Neurotransmitter- bzw. Neuromodulatorfunktion, vor allem für die rasch inaktivierbaren Enkephaline, sowie - speziell für die stabileren Peptide β -Endorphin und Dynorphin - eine Rolle als Neurohormon. Eine Beteiligung der endogenen Opioiden an der Reaktion des Organismus auf Schmerz und Stress wird ebenso diskutiert wie ein Zusammenhang mit dem kardiovaskulären System und endokrinen Mechanismen (Watson et al., 1984). Insbesondere dem β -Endorphin wird eine Beeinflussung des Immunsystems zugeschrieben (Chang, 1984).

1.2. Opioidtoleranz und -abhängigkeit

1.2.1. Begriffserklärungen

Der von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) vorgeschlagene Begriff der "drug dependence" beschreibt einen Zustand, der aus der wiederholten Verabreichung einer Droge über einen längeren Zeitraum hinweg resultiert und sowohl die Entwicklung von Toleranz als auch

von psychischer und physischer Abhängigkeit umfassen kann. Grundsätzlich müssen nicht alle drei Phänomene gemeinsam auftreten. Die WHO unterscheidet fünf "drug dependence"-Typen: den Morphin-, Barbiturat-, Kokain-, Amphetamin- und den Cannabis-Typ (WHO, 1964). Während bei der "drug dependence" des Amphetamin-, Kokain- und des Cannabis-Typs bei fehlender physischer Abhängigkeit neben geringfügiger Tendenz zur Toleranzentwicklung vor allem die psychische Abhängigkeit im Vordergrund steht, ist für Barbiturate sowie für morphinartige Analgetika die ausgeprägte Entwicklung aller drei Phänomene charakteristisch.

Wiederholter Kontakt des Organismus mit Opioiden führt zu einer Empfindlichkeitsverminderung gegenüber der Opioidwirkung (Toleranz). Nach Coper (1983) ist Toleranz "eine regulatorische Leistung, die den Organismus befähigt, gegen die Wirkung eines Pharmakons kompensatorisch zu reagieren, so daß nach wiederholter Gabe sein erwünschter Effekt nachläßt bzw. nur aufrechterhalten werden kann, wenn die Dosis erhöht wird". Innerhalb der einzelnen Opioidgruppen (z.B. unter μ -Agonisten) tritt Kreuztoleranz auf. "Mit Kreuztoleranz wird der Wirkungsverlust von Pharmaka ... bezeichnet, der primär durch wiederholte Gabe einer ähnlich wirkenden Substanz ... ausgelöst worden ist" (Coper, 1983). Bei Opioiden besteht eine charakteristische Neigung zur Tachyphylaxie ("akute" Toleranz), das heißt, daß sich bereits nach der ersten Zufuhr eines Opioids Toleranz entwickelt (Goldstein, 1974).

Die euphorisierende Wirkung der morphinartigen Opiode hat eine ausgeprägte psychische Abhängigkeit zur Folge und ist Ursache der mißbräuchlichen Anwendung von Opioiden. Die Anpassung des Organismus an kontinuierliche Opioidzufuhr bewirkt die Entstehung einer physischen Abhängigkeit, so daß die Anwesenheit des Opioids

zur Aufrechterhaltung der normalen physiologischen Funktionen erforderlich ist. Ein abruptes Absetzen des Opioids oder seine Verdrängung durch einen spezifischen Antagonisten führen zu einer Störung der Homöostase und somit zu schweren körperlichen Störungen, die sich als typisches Erscheinungsbild (Abstinenzsyndrom) äußern. Der Symptomenkomplex nach Entzug eines morphinartigen Analgetikums umfaßt unter anderem Aggressivität, Ruhe- und Schlaflosigkeit und vegetative Symptome wie Tränen- und Speichelfluß, Schweißausbrüche, Gänsehaut und Durchfall (Coper, 1983). Das beim Entzug eines chronisch verabfolgten morphinartigen Analgetikums auftretende Abstinenzsyndrom kann nur durch erneute Zufuhr eines morphinartigen Analgetikums aufgehoben werden. Innerhalb der Gruppe der "klassischen" Opioidanalgetika (z.B. Morphin, Pethidin, Methadon, Fentanyl) entwickelt sich Kreuzabhängigkeit; wird die Zufuhr eines derartigen Opioids nach chronischer Verabreichung unterbrochen, so können die Entzugssymptome durch ein beliebiges Opioid aus dieser Reihe verhindert bzw. aufgehoben werden (Jurna, 1983).

1.2.2. Theorien zum Mechanismus von Opioidtoleranz und -abhängigkeit

Die Beobachtung, daß Toleranz und Abhängigkeit während chronischer Opioidexposition des Organismus gemeinsam auftreten und - nach Absetzen des Opioids - wieder abklingen, veranlaßte eine Reihe von Autoren zu der Vermutung, beiden Phänomenen müsse ein gemeinsamer Mechanismus zugrundeliegen ("unitary mechanism"). Dieses Konzept basiert auf der Annahme, daß die Opioidwirkung eine Störung des physiologischen Fließgleichgewichts hervorruft (Himmelsbach, 1943). Es begreift Toleranz und Abhängigkeit als Ausdruck eines homöostatischen Regulationsmechanismus, dessen Aufgabe es ist, der durch

das Opioid verursachten Gleichgewichtsstörung entgegenzuwirken. Der auf diese Weise abgeschwächte Opioiddefekt (Toleranz) macht eine Dosissteigerung erforderlich. Erneute Gegenregulation führt letztendlich zu einer - durch das Opioid kontrollierten - Hypertrophie des durch die Opioidwirkung betroffenen physiologischen Systems, die sich bei Entzug des Opioids in Gestalt des Abstinenzsyndroms offenbart.

Die im folgenden beschriebenen Theorien stellen vorwiegend Varianten des "unitary mechanism"-Konzepts dar, die den Mechanismus der durch die Opioidwirkung induzierten gegenregulatorischen Prozesses auf unterschiedliche Weise zu erklären versuchen.

1.2.2.1. Änderung der neuronalen Empfindlichkeit

Die während chronischer Opioidexposition entstehende neuronale Übererregbarkeit begründeten Jaffe und Sharpless (1968) damit, daß inhibitorisch wirksame Substanzen zu einer verringerten Inanspruchnahme ("disuse") der betroffenen Nervenbahnen führen. Als kompensatorische Reaktion des Nervensystems auf "disuse" würde sich die Erregbarkeit erhöhen ("denervation supersensitivity"); die daraus resultierende Wirkungsminderung des Pharmakons würde eine Dosissteigerung erfordern (Toleranz). Beim Entzug des Pharmakons würde sich die Übererregbarkeit manifestieren.

Martin (1968) legte in seiner "Homeostatic and Redundancy Theory" die Existenz alternativer Nervenbahnen für eine einzelne physiologische Funktion zugrunde. Er erklärte den homöostatischen Mechanismus mit der reaktiven Hypertrophie einer oder mehrerer morphinunempfindlicher, alternativer Nervenbahnen. Die Bedeutung der morphinempfindlichen bzw. der -unempfindlichen Bahn

für die physiologische Funktion sowie die Kapazität der morphinunempfindlichen Bahn zur Hypertrophie hätten entscheidende Auswirkungen auf den Morphineffekt und auf die Toleranz- und Abhängigkeitsentwicklung in den verschiedenen funktionellen Systemen. Die Martin'sche "Redundancy"-Theorie bietet eine Erklärung dafür, warum sich gegenüber einzelnen Morphinwirkungen unterschiedlich schnell und intensiv Toleranz entwickelt und warum Morphin sowohl tonische Effekte (langanhaltend, mit nur geringer Toleranzentwicklung) als auch phasische Wirkungen (kurzdauernd, mit rascher Toleranzentwicklung) besitzt.

Unter der Voraussetzung, daß die Wirkung eines Pharmakons der Anzahl der zur Verfügung stehenden pharmakologischen Rezeptoren proportional ist, diskutierte Collier (1965; 1966; 1968) eine Reduktion der Anzahl der Rezeptoren als Ursache der nachlassenden Wirkung des Pharmakons. Die ständige Aktivierung der Rezeptoren während chronischer Pharmakonexposition könnte zu einer Inaktivierung und damit Verringerung der Anzahl funktionsfähiger Rezeptoren bzw. zu einer Umwandlung pharmakologisch aktiver Rezeptoren in sogenannte "stumme" Rezeptoren ("silent receptors"), die keine Wirkung vermitteln, führen. Ein derartiger Mechanismus würde zwar die Entwicklung von Toleranz, nicht jedoch von Abhängigkeit bzw. die neuronale Übererregbarkeit erklären. Collier bezog daher die Möglichkeit mit ein, daß auch die Wirkung von Neurotransmittern durch die Anzahl ihrer Rezeptoren bestimmt wird und einer homöostatischen Kontrolle unterliegt. Eine Verminderung der Transmittermenge würde von einer homöostatischen Gegenregulation durch eine Vermehrung der Rezeptoren kompensiert, während eine erhöhte Transmitterkonzentration die Reduktion der Rezeptorzahl zur Folge hätte. Hemmt das Pharmakon beispielsweise die Freisetzung und damit die Funktion eines exzitatorischen Neurotransmitters, würde

die Gegenregulation den Wirkungsverlust des Neurotransmitters durch eine Vermehrung seiner Rezeptoren ausgleichen. Die Folge davon wäre eine Wirkungsminderung des Pharmakons (Toleranz). Bei Entzug der Droge würde die Freisetzung des zuvor gehemmten Neurotransmitters rascher eintreten als eine entsprechende Reduktion der Rezeptoren. Ein im Überschuß freigesetzter exzitatorischer Transmitter fände seinen Ausdruck im Abstinenzsyndrom. Collier (1968; 1969) diskutierte einen potentiellen Zusammenhang zwischen einer Veränderung der Anzahl von Neurotransmitterrezeptoren und der bei chronischer Opioidzufuhr entstehenden Überempfindlichkeit gegenüber Neurotransmittern.

1.2.2.2. Die Enzymexpansionstheorie

Fast gleichzeitig entwickelten sowohl Shuster (1961) als auch Goldstein und Goldstein (1961) ein Konzept, das Toleranz und Abhängigkeit als Ausdruck der veränderten Syntheserate von Enzymsystemen begreift.

Im Gegensatz zur Theorie von Shuster (1961) fordert das von Goldstein und Goldstein (1961) entworfene Modell eine homöostatische Anpassung der für das Enzymfließgleichgewicht verantwortlichen Regulationsmechanismen. Der überarbeitete Entwurf der "Enzymexpansionstheorie" (Goldstein und Goldstein, 1968) basiert auf folgenden Überlegungen: Die Synthese eines Neurotransmitters unterliegt der Regulation durch ein Enzym; das Fließgleichgewicht des Transmitters wird durch Freisetzung bzw. Abbau gesteuert. Das Enzym unterliegt ebenfalls einer homöostatischen Regulation: reduziert sich der Neurotransmitter, wird das Enzym aktiviert; größere Mengen des Transmitters hemmen das Enzym. Wird das Enzym durch ein Pharmakon gehemmt, so resultiert eine geringere Menge des Transmitters. Infolge homöostati-

scher Gegenregulation wird das Enzym aktiviert, und gegenüber der Pharmakonwirkung entwickelt sich Toleranz. Im hochtoleranten Zustand sind die Pharmakon- und Enzymkonzentrationen hoch, die Konzentration des Transmitters wird durch den homöostatischen Mechanismus normal gehalten. Im Entzug wird infolge der enthemmten Aktivität einer großen Menge des Enzyms sehr viel (exzitatorischer) Neurotransmitter produziert (Entzugssyndrom). Die hohe Transmitterkonzentration führt zum verstärkten Abbau des Enzyms, und sowohl die Enzym- als auch die Transmitterkonzentration normalisieren sich wieder.

Es gibt inzwischen Hinweise dafür, daß es sich bei dem postulierten Enzymsystem um das cAMP-System handelt. Untersuchungen morphinabhängiger Ratten weisen auf einen engen Zusammenhang zwischen der Abhängigkeitsentwicklung und dem cAMP hin (Collier und Francis, 1975; Collier et al., 1974; Collier und Roy, 1974; Francis et al., 1975; Mehta und Johnson, 1974). Sharma et al. (1975 a,b) zeigten an Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen eine rapide Hemmung der Adenylatcyclaseaktivität und eine Reduktion der intrazellulären cAMP-Konzentration durch Morphin. Bei chronischer Exposition der Zellen gegenüber Morphin beobachteten sie ein verzögert einsetzendes Wiederaansteigen der Cyclaseaktivität und eine Normalisierung der cAMP-Konzentration (Toleranz). Im Entzug stieg die cAMP-Konzentration zunächst rapide an, im weiteren Verlauf fiel sie jedoch auf ihr ursprüngliches Niveau zurück (Sharma et al., 1975 a). Sämtliche Morphineffekte waren stereospezifisch und mit Naloxon kompetitiv blockierbar. Die Beteiligung des cAMP als "second messenger" an zahlreichen physiologischen Funktionen und seine Beeinflussung durch Opiode wurde als eine Möglichkeit betrachtet, die Auswirkungen der Opiode auf eine Reihe von vermeintlichen Neurotransmittern (z.B. ACh, Serotonin, SP, Katecholamine)

auf einen gemeinsamen Nenner zu bringen (Collier und Francis, 1978).

1.3. Problemstellung

Die allgemeine Auffassung, daß die Entwicklung von Toleranz und Abhängigkeit gegenüber einem Opioid grundsätzlich mit Kreuztoleranz und Kreuzabhängigkeit gegenüber allen anderen Opioiden verbunden ist, wurde seit der Entdeckung der multiplen Opioidrezeptoren wiederholt in Frage gestellt. Untersuchungen am spinalisierten Hund ergaben, daß chronische Infusion mit dem κ -Agonisten Ketocyclazocin oder mit dem μ -Agonisten Morphin zu selektiver Toleranz gegenüber dem jeweils verabreichten Opioid führt: es wurde keine Kreuztoleranzentwicklung zwischen μ - und κ -Agonisten beobachtet (Gilbert und Martin, 1976; Martin et al., 1976). An isolierten Organen mit multiplen Opioidrezeptorpopulationen - wie etwa dem Meerschweinchenileum und dem Samenleiter der Maus - wurde gezeigt, daß nach chronischer Zufuhr eines selektiven Opioids in vivo die betreffende Opioidrezeptorpopulationen in ihrer Empfindlichkeit weitgehend unverändert bleiben (Schulz et al., 1980 a,b; 1981 b,c; Wüster et al., 1981 a,b).

Entsprechend jener Theorien, die einen gemeinsamen Mechanismus für Opioidtoleranz und -abhängigkeit postulieren ("unitary mechanism", siehe 1.2.2.), sollte man erwarten, daß sich an chronisch aktivierten Rezeptoren sowohl Toleranz als auch Abhängigkeit selektiv, d.h. nur an dieser spezifischen Rezeptorpopulation, entwickeln. In Übereinstimmung mit diesem Konzept stellten Way et al. (1969) bei chronisch mit Morphin behandelten Mäusen eine enge Korrelation zwischen Toleranz- und Abhängigkeitsentwicklung fest. Andere Studien erbrachten den Nachweis, daß Opioidtoleranz auch ohne Abhängigkeit

auftreten kann. Von Hano et al. (1963) wurden bei Mäusen nach chronischer Morphinzufuhr zwar Toleranzentwicklung, aber keine Entzugssymptome beschrieben. Untersuchungen an Samenleiterpräparaten chronisch mit Opioiden behandelter Mäuse ergaben, daß die Samenleiter hochtolerant gegenüber dem chronisch verabreichten Opioid waren (selektive Toleranz), jedoch bei Entzug des Opioids mit Hilfe eines kompetitiven Opioidantagonisten keinerlei Abstinenzsymptom erkennen ließen (Gillan et al., 1979; Rubini et al., 1982; Schulz et al., 1980 a,b).

Wie diese Befunde erkennen lassen, hat chronische Aktivierung von Opioidrezeptoren offensichtlich die Entstehung einer Toleranz zur Folge, die allerdings nicht mit Abhängigkeitsentwicklung einhergehen muß. Es erscheint somit fraglich, ob adaptive Veränderungen des Opioidrezeptors grundsätzlich durch die gemeinsame Entwicklung von Toleranz und Abhängigkeit charakterisiert sind. Entgegen dem Konzept des "unitary mechanism" ist anzunehmen, daß es eine Dissoziation von Toleranz und Abhängigkeit geben kann. Ein dissoziierender Verlauf von Toleranz- und Abhängigkeitsentwicklung erfordert die Existenz mehrerer, für die Entstehung von Toleranz verantwortlicher Mechanismen. Es ist wahrscheinlich nicht davon auszugehen, daß derjenige Mechanismus, durch welchen beide Phänomene bedingt sind, mit jenem identisch ist, dem eine Toleranzentwicklung ohne gleichzeitige Entstehung von Abhängigkeit zugrundeliegt. Vermutungen über eine Beteiligung mehrerer Mechanismen an der Toleranzentstehung wurden beispielsweise von Cox (1978) in Anbetracht des zweiphasig verlaufenden Abklingens der Toleranz nach Entzug des Opioids angestellt.

Eine Erklärung für das Auftreten von Toleranz ohne Abhängigkeit wären Veränderungen auf der Rezeptorebene,

wobei sowohl die Bindungskomponente des Opioidrezeptors als auch das der Bindungsstelle nachgeschaltete System betroffen sein könnten. Die Fähigkeit von Zellen mit Hormonrezeptoren, die Zahl und/oder Affinität von Rezeptoren entsprechend den Konzentrationsveränderungen der jeweiligen Agonisten zu regulieren, wurde anhand einer Fülle von Untersuchungen dokumentiert: in Gegenwart hoher Agonistenkonzentrationen kann man eine beschleunigte Desaktivierung der Rezeptoren beobachten, d.h. infolge einer chronischen Stimulation des Rezeptorsystems wird die Rezeptorenanzahl reduziert ("down regulation"); dieser Vorgang ist im allgemeinen reversibel: nach Entfernung des Agonisten regenerieren sich die Rezeptoren wieder (Catt et al., 1979; Raff, 1975). Für Insulinrezeptoren wurde mit zunehmender Sättigung der Bindungsstellen eine Verringerung der Rezeptoraffinität ("negative Kooperativität") gefunden (De Meyts et al., 1973). Bei Hormon- und Neurotransmitter-Rezeptoren wurden als Folge der Agonist-Rezeptor-Interaktion die Aggregation mehrerer Agonist-Rezeptor-Komplexe und anschließende Internalisierung beschrieben (Catt et al., 1979; Chuang und Costa, 1979); die Internalisierung wurde als möglicher Mechanismus der Rezeptorreduktion diskutiert. Analog könnte sich auch die Anzahl aktiver Opioidrezeptoren während chronischer Opioidexposition verringern; dies wäre in Übereinstimmung mit den Überlegungen von Collier (siehe 1.2.2.1.).

Die vorliegende Arbeit behandelt in erster Linie die Problematik der Dissoziation von Toleranz- und Abhängigkeitsentwicklung, wobei die zentrale Frage lautete: Entstehen Toleranz und Abhängigkeit - bedingt durch einen beiden Phänomenen zugrundeliegenden Mechanismus - gemeinsam, oder ist eine Dissoziation von Toleranz- und Abhängigkeitsentwicklung möglich?

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde das Längs-

muskelpräparat des Meerschweinchenileums benutzt. Es ist ein klassisches Modell für das Studium der Phänomene Opioidtoleranz und -abhängigkeit. Das dem Längsmuskel anhaftende Nervengewebe, der Plexus myentericus (Auerbach'scher Plexus) enthält zwei funktionelle Opioidrezeptorpopulationen (μ - und κ -Rezeptoren, Leslie et al., 1980; Lord et al., 1977; Schulz et al., 1981 b, c), die bei chronischer Aktivierung selektive Toleranz entwickeln (Schulz et al., 1981 b,c; Wüster et al., 1981 a,b). Am Plexus myentericus ist auch Abhängigkeit demonstrierbar; der mit Hilfe eines Opioidantagonisten präzipitierte Entzug ruft eine charakteristische Entzugskontraktur des Längsmuskels hervor (Ehrenpreis et al., 1972; Schulz und Herz, 1976 a). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht,

1. ob die für die multiplen Opioidrezeptoren des Plexus myentericus beschriebene selektive Toleranzentwicklung nach chronischer Aktivierung mit selektiver Abhängigkeitsentwicklung einhergeht bzw.
2. auf welche Weise Toleranz- und Abhängigkeitsentwicklung im Plexus myentericus miteinander korreliert sind.

Um der weiteren Frage nachzugehen, ob auf der Rezeptorbindungsebene die Ursache der Toleranz zu suchen ist, wurden die Bindungsdaten von Hirnhomogenaten morphintoleranter Ratten nach der Methode von Scatchard (1949) analysiert.

2. Ergebnisse

2.1. Opioidtoleranz und -abhängigkeit am Längsmuskelpräparat des isolierten Meerschweinchenileums

2.1.1. Das isolierte Meerschweinchenileum

2.1.1.1. Anatomischer Aufbau

In Abb. 2 ist der vereinfachte Aufbau der Dünndarmwand im Querschnitt dargestellt. Zwischen der von der Serosa überzogenen Längsmuskelschicht und dem Ringmuskel liegt ein vegetatives Nervengeflecht, der Plexus myentericus (Auerbach'scher Plexus), der Längs- und Ringmuskulatur innerviert. Der unter der Ringmuskelschicht gelegene Plexus submucosus (Meissner'scher Plexus) innerviert die Schleimhaut. Die Schleimhaut besteht aus einer

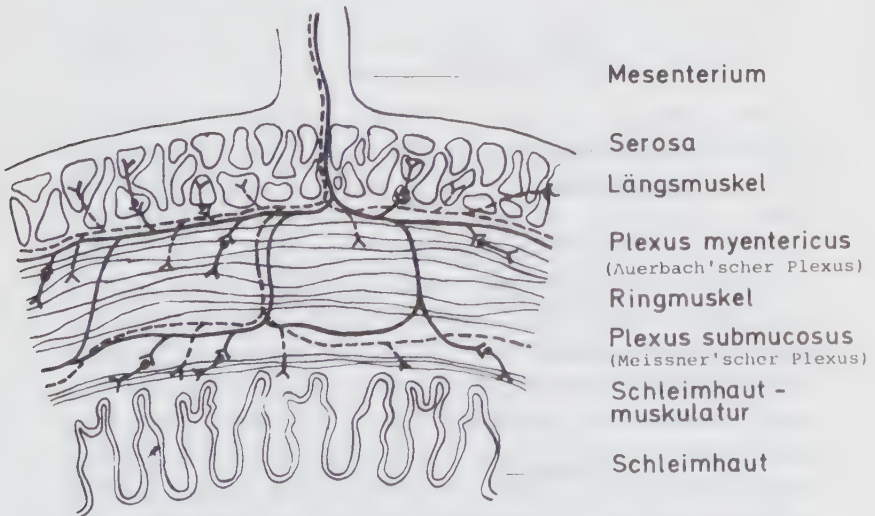


Abb. 2 Aufbau der Dünndarmwand im Querschnitt (vereinfacht nach Netter, 1958).

eigenen feinen Muskulatur sowie aus Bindegewebe und einer Epithelschicht.

Die Nerven werden entlang der Blut- und Lymphgefäße im Mesenterium zum Darm geführt. Die Abb. zeigt aus Gründen der Übersichtlichkeit nur efferente parasymphatische (prä- und postganglionäre) und sympathische (postganglionäre) Nervenbahnen; auf die Darstellung der afferenten Nerven wurde verzichtet. Über Einzelheiten des Verschaltungssystems der beiden Nervengeflechte ist noch wenig bekannt. Für in-vitro Versuche wird sowohl das intakte Meerschweinchenileum (Guinea-Pig Ileum = GPI) als auch das Längsmuskelpräparat mit anhaftendem Plexus myentericus (Rang, 1964) verwendet. Letzterem wurde in der vorliegenden Arbeit der Vorzug gegeben, da es die für die Untersuchungen nötigen Gewebe - Muskel und Nervengeflecht - enthält, Einflüsse von Darmmukosa bzw. Ringmuskel jedoch entfallen.

2.1.1.2. Akute Opioidwirkungen

Trendelenburg (1917) entdeckte als erster, daß Morphin in kleinen Mengen den peristaltischen Reflex des isolierten Meerschweinchenileums hemmt. Infolge elektrischer Stimulation des GPI wird aus dem Nervengewebe Acetylcholin (ACh) freigesetzt (Paton, 1955; 1977; Schaumann, 1957). Morphin reduziert die ACh-Freisetzung, wobei es weder die ACh-Synthese hemmt, noch die Empfindlichkeit des Muskels gegenüber exogenem ACh herabsetzt (Schaumann, 1957). Schaumann folgerte daraus, daß Morphin die ACh-Ausschüttung indirekt, und zwar über eine Verminderung der Erregbarkeit postganglionärer Nervenbahnen, hemmt. Die Beeinflussung der ACh-Freisetzung durch Opiode ist stereospezifisch und durch Opioidantagonisten blockierbar; sie verläuft proportional zu der Hemmwirkung auf die elektrisch stimu-

lierten Muskelkontraktionen (Cox und Weinstock, 1966). Elektrophysiologische Studien an Neuronen des Plexus myentericus zeigten ebenfalls eine stereospezifische und durch Naloxon antagonisierbare Hemmung der elektrischen Aktivität durch Morphin (Dingledine und Goldstein, 1975, 1976; Sato et al., 1973, 1974). Intrazelluläre elektrophysiologische Untersuchungen ergaben, daß Opioide die Aktivität myenterischer Neurone durch eine (stereospezifische und antagonisierbare) Hyperpolarisierung der Nervenmembran hemmen (North und Tonini, 1977). Interessanterweise korreliert die Wirkung der Opioide auf den Plexus myentericus des Meerschweinchens mit der analgetischen Wirkungsstärke der jeweiligen Agonisten am Menschen (Kosterlitz und Waterfield, 1975); sie erfolgt über spezifische Opioidrezeptoren (Leslie et al., 1980; Lord et al., 1977; Schulz et al., 1981 b, c). Als Maß für die Wirkungsstärke von Opioidagonisten am Meerschweinchenileum gilt die ED_{50} , d.h. diejenige Konzentration des Opioids, die eine 50-%ige Hemmung der elektrisch stimulierten Kontraktion bewirkt.

2.1.1.3. Wirkungen von Neurotransmittern und spasmogenen Substanzen

Ähnlich den Opioiden üben die Katecholamine einen dosisabhängigen hemmenden Einfluß auf die ACh-Freisetzung aus dem Plexus myentericus aus. Diese Wirkung der Katecholamine läuft in erster Linie über α_2 -Adrenozeptoren ab (Paton und Vizi, 1969). Katecholamine antagonisieren außerdem die exzitatorische Wirkung von ACh auf den glatten Muskel; dieser Effekt wird durch β -Adrenozeptoren vermittelt (Kosterlitz et al., 1970). Die Blockade adrenerger α - und β -Rezeptoren mit entsprechenden Antagonisten hat keine Beeinträchtigung der Morphinwirkung zu Folge; Morphin übt seine Wirkung also nicht über

eine Freisetzung von Katecholaminen aus (Gyang und Kosterlitz, 1966).

Im Gegensatz zu den Opioiden und Katecholaminen wirken Serotonin und Substanz P am Meerschweinchenileum exzitatorisch. Serotonin wird im Nervengewebe aus Interneuronen freigesetzt (Costa und Furness, 1979); wahrscheinlich führen die durch Serotonin ausgelösten Aktionspotentiale zur Freisetzung von ACh an den Nervenendigungen (Adam-Vizi und Vizi, 1978). Die Serotoninfreisetzung wird durch Morphin nicht beeinflusst (Schulz und Cartwright, 1974). Die exzitatorische Wirkung der im Meerschweinchenileum hochkonzentriert vorliegenden Substanz P (Costa et al., 1980) erfolgt teils über einen direkten Angriff auf den Muskel, teils indirekt über eine Aktivierung cholinergischer Neuronen (Yau und Youther, 1982). Es gibt Hinweise dafür, daß die durch Substanz P aktivierten Neurone auch einer Kontrolle durch endogene Opioidpeptide unterliegen (Holzer et al., 1983). Zu den spasmogen wirksamen Substanzen gehören unter anderem auch Prostaglandin E₁, Bradykinin und das Neuropeptid Neurotensin, das über eine Freisetzung von ACh aus den parasympathischen Nervenendigungen Kontraktionen hervorruft (Kitabgi und Freychet, 1979).

2.1.1.4. Chronische Opioidwirkungen

Darmpräparate aus chronisch mit Opioiden behandelten Tieren weisen im Vergleich zu unbehandelten (naiven) Präparaten eine verringerte Empfindlichkeit (Toleranz) gegenüber dem zugeführten Opioid auf (Goldstein und Schulz, 1973). In Anwesenheit des chronisch verabreichten Opioids im Medium wurden hohe Toleranzgrade, begleitet von einer verringerten maximalen Wirksamkeit des Opioids, beschrieben (Cox, 1978; Schulz und Herz, 1976 a). Wird das Opioid entzogen, kommt es zu einem

deutlichen Wiederanstieg der Empfindlichkeit gegenüber dem Opioid. Der Prozeß, der zur ursprünglichen Empfindlichkeit zurückführt, ist durch einen zweiphasigen Verlauf gekennzeichnet (Cox, 1978; Goldstein und Schulz, 1973; Schulz und Herz, 1976 a). Dies veranlaßte Cox (1978), die Entwicklung zweier Toleranztypen zu postulieren: Typ I, der die maximale Wirkungsstärke des Opioids verringert, ist an die Anwesenheit der Droge gebunden und wird nach Entfernung der Droge rasch abgebaut; Typ II, der durch die nach rechts verschobene Dosis-Wirkungskurve des Opioids charakterisiert ist, ist nicht an die Anwesenheit der Droge gebunden und wird allmählich reduziert.

Chronisch opioidexponierte Präparate reagieren auf die Zugabe von Naloxon mit einer ausgeprägten Entzugskontraktur, die durch Atropin und Tetrodotoxin blockiert wird und auf einer Freisetzung von ACh beruht (Ehrenpreis et al., 1972; Schulz und Herz, 1976 a). Das Präzipitieren des Entzugssymptoms ist an die Anwesenheit eines Opioidantagonisten am Rezeptor gebunden (Abb. 3). Nach Reinkubation eines entzogenen Präparates mit dem Agonisten läßt sich erneut eine Entzugskontraktur induzieren (Schulz und Herz, 1976 a). Im entzogenen Zustand zeigen die Darmpräparate eine verminderte Reaktion auf Katecholamine, während sie gegenüber der exzitatorischen Wirkung von Serotonin und Prostaglandin E_1 besonders empfindlich sind (Gillan et al., 1979; Schulz und Goldstein, 1973; Schulz und Herz, 1976 a). Bei Studien am intakten Ileum beobachtete Gintzler (1979; 1980) während der Entzugskontraktur nicht nur eine vermehrte ACh-Freisetzung, sondern auch eine verstärkte Ausschüttung von Serotonin und Substanz P. Substanz P spielt möglicherweise beim Abhängigkeits- bzw. Entzugsgeschehen eine nicht unbedeutende Rolle (Chahl, 1983; Collier, 1984).

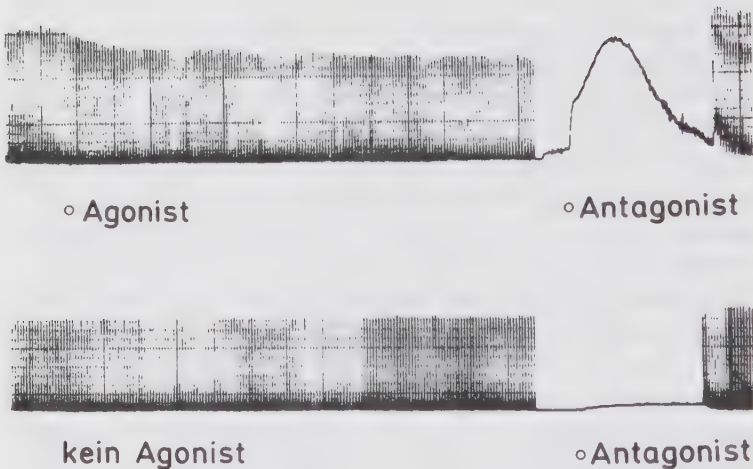


Abb. 3
Entzugskontraktur eines abhängigen GPI-Präparates. Der Antagonist (Naloxon) präzipitiert nur in Gegenwart des Agonisten (oberer Teil der Abbildung), nicht jedoch in dessen Abwesenheit ("kein Agonist") eine Entzugskontraktur. Vor dem Entzug wird die elektrische Stimulation abgeschaltet.

2.1.2. Untersuchungen zur Opioidabhängigkeit an Präparaten mit intakten Opioidrezeptoren

2.1.2.1. Vorbemerkungen

Geht man entsprechend dem "unitary mechanism"-Konzept davon aus, daß Toleranz und Abhängigkeit Ausdruck desselben biochemischen Mechanismus sind (siehe 1.2.2.), wäre zu fordern, daß sich - analog zur selektiven Toleranz - Abhängigkeit ebenfalls selektiv an der jeweils chronisch aktivierten Opioidrezeptorpopulation entwickelt. Die Studien am Meerschweinchenileum sollten also zeigen, ob chronische Aktivierung der einzelnen

Opioidrezeptorpopulationen des GPI (μ, κ) zu selektiver Abhängigkeit oder zu Kreuzabhängigkeit führt.

Der Toleranz- bzw. Kreuztoleranzgrad von Opioidrezeptoren des GPI läßt sich einfach über eine Ermittlung der ED_{50} -Werte von Opioidagonisten feststellen. Der Quotient ED_{50} am toleranten GPI / ED_{50} am unbehandelten GPI bezeichnet den Grad der Toleranz. Die Demonstration der Abhängigkeit eines GPI-Präparates erfolgt durch Präzipitation eines Entzugssymptoms mit Hilfe eines Opioidagonisten. Als Ausdruck der Abhängigkeit gilt die charakteristische Entzugskontraktur (Abb. 3). Um festzustellen, an welcher Opioidrezeptorpopulation sich Abhängigkeit entwickelt hat, ist es erforderlich, die präzipitierte Kontraktur einer bestimmten Population zuzuordnen. Löst beispielsweise die Verdrängung eines Agonisten von einer bestimmten Rezeptorpopulation durch einen selektiven Antagonisten eine Entzugskontraktur aus, wäre dies der Beweis für den abhängigen Zustand der betreffenden Rezeptorpopulation. Im Gegensatz zu einer Reihe hochselektiver Opioidagonisten steht jedoch kein Opioidantagonist mit ausreichender Selektivität und gleichzeitiger hoher antagonistischer Potenz zur Verfügung. Es wurde daher ein Versuchsschema entwickelt, das mit dem Einsatz selektiver Agonisten und des hochwirksamen, aber relativ unselektiven Antagonisten Naloxon auskommt.

Ausgangspunkt entsprechender Überlegungen waren Untersuchungen von Schulz und Herz (1976 a), die Charakteristika der GPI-Entzugssymptomatik erarbeitet hatten (Abb. 4). Es ist ein entscheidendes Kriterium, daß der abhängige Zustand eines chronisch opioidexponierten GPI nur nachzuweisen ist, wenn sich zum Zeitpunkt des Entzugs das Opioid am Rezeptor befindet. Die Intensität der Entzugskontraktur ist abhängig von der Opioidkonzentration im Medium. Wird der Agonist vollständig ent-

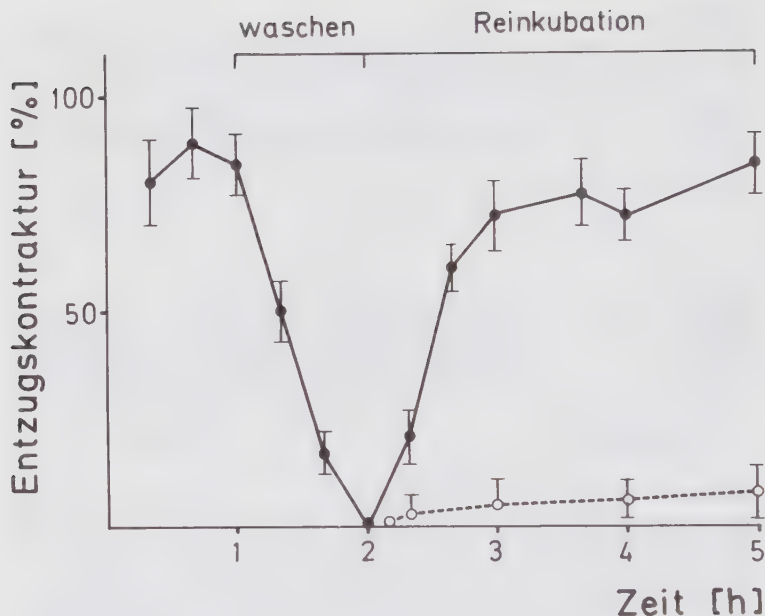


Abb. 4

Mit Naloxon präzipitierte Kontraktoren morphinabhängiger und unbehandelter GPI-Präparate (nach Schulz und Herz, 1976 a). Ordinate: Entzugskontraktoren (% S.E.M.); Abszisse: Zeit des Aufenthalts der Präparate im Organbad (h).

fernt, präzipitiert Naloxon keine Entzugskontraktur. Wird das Opioid erneut zugesetzt (Reinkubation), löst Naloxon das Entzugssymptom wieder aus. Inkubation unbehandelter Präparate mit dem Opioid und nachfolgender "Entzug" mit Naloxon kann vor allem bei längerfristiger Opioidexposition (mehrere Stunden) in einzelnen Fällen unwesentliche Kontraktoren bedingen.

Somit bilden folgende Merkmale der Entzugssymptomatik des isolierten Meerschweinchenileums die Grundlagen für den Aufbau des unter 2.1.2.2. beschriebenen Versuchsschemas:

1. Naloxon löst nur unter bestimmten Voraussetzungen eine Entzugskontraktur aus:
 - die Opioidrezeptoren des Plexus myentericus müssen chronisch aktiviert, d.h. abhängig sein;
 - ein Opioidagonist, der durch Naloxon kompetitiv verdrängbar sein sollte, muß in ausreichender Konzentration am Rezeptor vorhanden sein;
 - Naloxon muß in ausreichend hoher Konzentration zugesetzt werden, um den Agonisten kompetitiv zu verdrängen.
2. Bei chronisch opioidexponierten Präparaten, denen das Opioid vollständig entzogen wurde und die daher nicht mehr auf Naloxon reagieren, kann die Bereitschaft zum Abstinenzsymptom durch erneute Inkubation mit dem Opioid (Reinkubation) reinduziert werden.
3. Mit Opioiden inkubierte Präparate, deren Opioidrezeptoren in vivo nicht chronisch aktiviert wurden, zeigen nach Naloxonexposition keine oder nur eine schwache Kontraktur.

Unterstellt man, daß sich an der chronisch mit einem selektiven Agonisten aktivierten Opioidrezeptorpopulation selektive Abhängigkeit entwickelt, wäre beispielsweise zu erwarten, daß Präparate nach chronischer Infusion mit einem μ -Agonisten abhängige μ -Rezeptoren, jedoch gleichzeitig "naive" κ -Rezeptoren besitzen. In diesem Fall würde Naloxon nur nach Reinkubation mit einem κ -Agonisten eine Entzugskontraktur auslösen; nach Reinkubation mit κ -Agonisten sollte die Reaktion auf Naloxon mit derjenigen unbehandelter Präparate vergleichbar sein.

Zeigen dagegen chronisch mit einem μ -Agonisten infundierte Präparate auch nach Reinkubation mit κ -Agonisten

ein Entzugssymptom, wäre dies Ausdruck der gleichzeitigen Existenz abhängiger μ - und abhängiger κ -Rezeptoren, d.h. von Kreuzabhängigkeit. Entsprechendes würde auch im umgekehrten Fall - nach chronischer Infusion eines κ -Agonisten - gelten.

μ -tolerantes Präparat

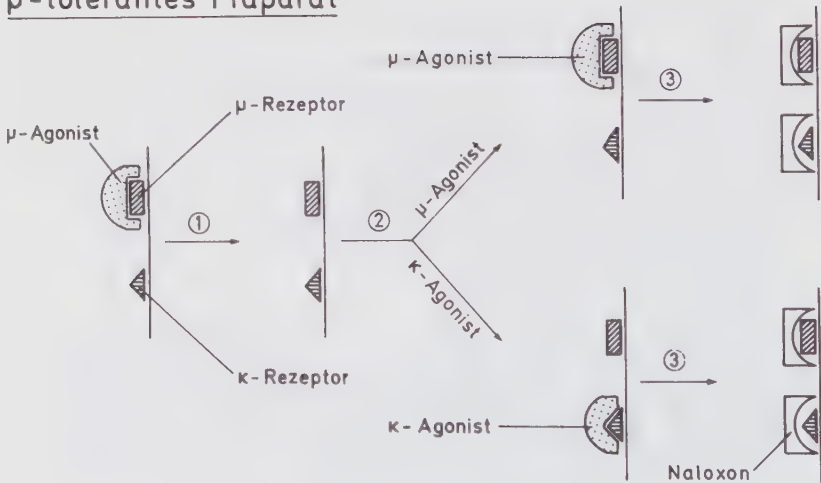


Abb. 5
Versuchsschema am Beispiel eines GPI-Präparates mit chronisch aktivierten μ -Rezeptoren. Schritte: Demaskierung der chronisch aktivierten Rezeptoren (1), Reinkubationsphase (2), präzipitierter Entzug (3).

2.1.2.2. Versuchsschema

Entsprechend den in 2.1.2.1. aufgeführten Überlegungen wurde ein Versuchsschema entwickelt (Abb. 5), dessen einzelne Schritte am Beispiel chronisch morphinexponierter Präparate erläutert werden sollen.

1 Demaskierung der chronisch aktivierten Rezeptoren

Eine chronische Infusion der Meerschweinchen mit Morphin führt zu einer Exposition des Organismus - einschließlich des Ileums - mit dem Opioid. Wenn das aus dem chronisch infundierten Tier gewonnene Längsmuskelpräparat in das Organbad eingebracht wird, befindet sich noch Morphin im Gewebe. Es ist zu diesem Zeitpunkt möglich, mit Naloxon eine Entzugskontraktur auszulösen (Schulz und Herz, 1976 a); es ist anzunehmen, daß das im Gewebe befindliche Morphin als μ -Agonist ausschließlich mit den μ -Rezeptoren des Plexus myentericus interagiert, und somit dürfte die Entzugskontraktur auf die Verdrängung des Morphins von abhängigen μ -Rezeptoren zurückzuführen sein. Will man nun untersuchen, ob sich auch an den κ -Rezeptoren Abhängigkeit entwickelt hat, muß vor der Inkubation mit einem κ -Agonisten das chronisch verabfolgte Morphin ausgewaschen werden. Befindet sich nämlich während der Inkubation der Präparate mit einem κ -Agonisten auch Morphin an den μ -Rezeptoren, könnte das sowohl mit μ - als auch mit κ -Rezeptoren interagierende Naloxon eine Entzugskontraktur präzipitieren, die sowohl der μ - als auch der κ -Rezeptorpopulation zugeordnet werden kann. Die Präparate werden daher einer Waschprozedur unterzogen, bis sämtliche Rezeptoren im demaskierten Zustand vorliegen; unter diesen Bedingungen darf Naloxon keine Entzugskontraktur induzieren (Schulz und Herz, 1976 a). Nach der Waschprozedur werden die Präparate jeweils mit definierten Konzentrationen von μ - oder κ -Agonisten reinkubiert, die selektive μ - oder κ -Rezeptoraktivierung gewähr-

leisten.

2 Reinkubationsphase

Die Wahl des Agonisten für die Reinkubation ist von entscheidender Bedeutung für die Zuordnung der Entzugskontraktur zu einer bestimmten Rezeptorpopulation. Der Agonist sollte eine hohe Rezeptorselektivität besitzen und in einer Konzentration zugesetzt werden, die eine Überlappung auf die andere Rezeptorpopulation ausschließt. Ein nichtselektiver Agonist wie etwa Etorphin oder eine aufgrund zu hoher Konzentration erfolgte Überlappung eines selektiven Agonisten auf die andere Rezeptorpopulation würde keine exakte Zuordnung der präzipitierten Entzugskontraktur erlauben, da sowohl μ - als auch κ -Rezeptoren gleichzeitig besetzt wären. Die Konzentration des Agonisten sollte jedoch hoch genug sein, um die Präzipitation einer deutlichen Entzugskontraktur zu ermöglichen.

3 Präzipitierter Entzug

Naloxon verdrängt die Agonisten von deren Rezeptoren. Da nur Rezeptoren, die durch ein Opioid besetzt und somit aktiviert sind, nach Naloxonzugabe eine Entzugskontraktur auslösen, kann das Entzugszeichen einer bestimmten Rezeptorpopulation zugeordnet werden. Die durch Naloxon hervorgerufene Kontraktur ist Ausdruck des abhängigen Zustands derjenigen Opioidrezeptorpopulation, die in der Reinkubationsphase aktiviert wurde.

2.1.2.3. Versuchsbedingungen

Der Durchführung der Versuche nach dem oben beschriebenen Schema ging die Ermittlung der optimalen experimentellen Bedingungen voraus. Grundsätzlich war dabei zu berücksichtigen, daß sich die Fähigkeit des Längsmuskelpräparates zu einer intensiven Entzugskontraktur

verringert, wenn es über längere Zeit entzogen wird. Insbesondere die Auswaschzeiten sollten daher so kurz wie möglich sein.

Zur Untersuchung der Opioidabhängigkeit im Plexus myentericus nach chronischer Aktivierung der μ -Rezeptoren wurde der prototypische μ -Agonist Morphin infundiert. Für die chronische Infusion von Morphin in vivo fanden an Stelle der gebräuchlichen Morphinpellets (Goldstein und Schulz, 1973) osmotische Minipumpen Verwendung; diese Applikationsart hat den Vorzug einer gleichmäßigen Wirkstoffabgabe und gewährleistet daher eine konstante Aktivierung der jeweiligen Rezeptoren. Ebenfalls mittels osmotischer Minipumpen erfolgte die in vivo-Infusion der κ -Agonisten Ethylketocyclazocin (EKC) und MRZ 2549, die der Untersuchung der Abhängigkeit nach chronischer Aktivierung der κ -Rezeptoren dienen sollte. Endogene κ -Liganden wie Dynorphin A und α -Neo-Endorphin waren aufgrund ihrer Empfindlichkeit gegenüber enzymatischem Abbau für die in vivo-Infusion ungeeignet. Grundsätzlich erschien der Einsatz unterschiedlicher κ -Agonisten angebracht, da die vorausgegangenen Kreuztoleranzstudien Hinweise auf eine uneinheitliche κ -Rezeptorpopulation im GPI ergeben hatten (Schulz et al., 1981 c). Um dem Einfluß der Dosis des in vivo verabreichten Opioids auf die Selektivität der Abhängigkeitsentwicklung Rechnung zu tragen, wurden zwei unterschiedlich hohe Infusionskonzentrationen der Agonisten gewählt. Die Infusionsdosis wurde auf die Wirkungsstärke der Opioiden am GPI abgestimmt. So erhielten die Tiere relativ niedrige Konzentrationen des potenten κ -Agonisten MRZ 1549 (0.5 und 5 $\mu\text{g/h}$), während von dem weniger wirksamen κ -Agonisten EKC und dem μ -Agonisten Morphin höhere Konzentrationen verabreicht wurden (EKC: 5 und 50 $\mu\text{g/h}$; Morphin: 10 und 100 $\mu\text{g/h}$).

Um in vitro demaskierte Rezeptoren zu erhalten, mußte

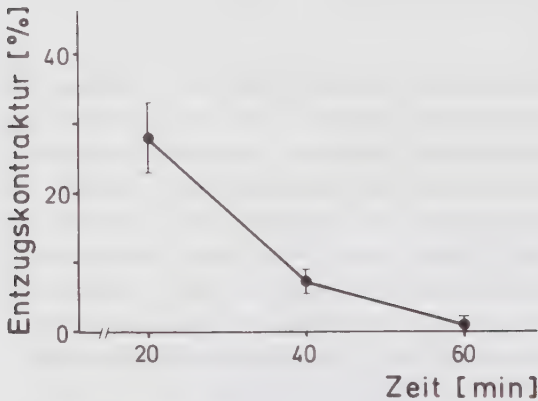


Abb. 6
Erforderliche Auswaschzeit zur vollständigen Entfernung des chronisch infundierten Opioids aus dem Gewebe (Indikator für die Anwesenheit des Agonisten: eine durch Naloxon präzipitierbare Entzugskontraktur). Ordinate: Entzugskontraktur (% $\pm$ S.E.M.); Abszisse: getestete Waschzeiten (min). (Exp. Bed.: 10 μ g/h Fentanyl)

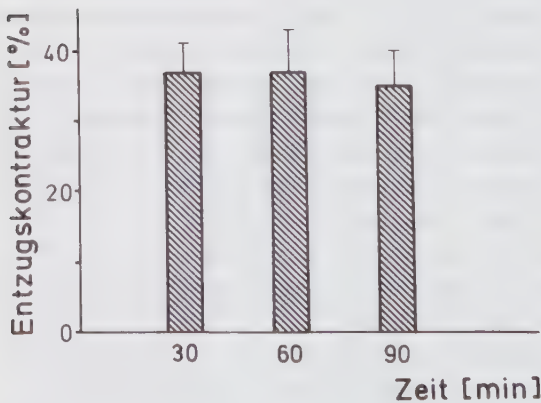


Abb. 7
Erforderliche Reinkubationszeit. Ordinate: Entzugskontraktur (% $\pm$ S.E.M.); Abszisse: getestete Reinkubationszeiten (min). (Exp. Bed.: 10 μ g/h Fentanyl; in vitro 2 nM Fentanyl).

das in vivo infundierte Opioid aus dem GPI-Präparat ausgewaschen werden. Als Indiz für die Anwesenheit des Opioids im chronisch exponierten Präparat diente die durch Naloxon präzipitierbare Entzugskontraktur. Eine Waschzeit von 60 Minuten, wobei das Medium im Fünf- bis Zehnminutenintervall erneuert wurde, erwies sich als ausreichend (Abb. 6). Dies war in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Schulz und Herz (1976 a).

Die Reinkubationsphase sollte lange genug sein, um dem System eine Readaptation an das Opioid zu ermöglichen. Schulz und Herz (1976 a) hatten gezeigt, daß zur Auslösung einer intensiven Entzugskontraktur eine Reinkubationszeit von mindestens 30 Minuten erforderlich ist (Abb. 4). Der Vergleich von 30, 60 und 90 Minuten Inkubation (Abb. 7) macht deutlich, daß sich längere Inkubationsphasen als 30 Minuten erübrigen.

Für die Reinkubation fanden die selektiven κ -Agonisten EKC, MRZ 2549, Dynorphin A(1-13) und α -Neo-Endorphin (1-8) sowie der μ -Agonist Normorphin Verwendung. Normorphin wurde aufgrund seines hydrophileren Verhaltens dem Morphin vorgezogen. Da eine hohe Rezeptorselektivität erwünscht war, wurden bei der Inkubation möglichst niedrige Konzentrationen eingesetzt, die je nach der Dosis des in vivo verabreichten Opioids variierten. War den Tieren eine geringe Opioiddosis infundiert worden, wurden die Inkubationskonzentrationen aus dem ED₅₀-Bereich des jeweiligen Opioids am unbehandelten Präparat gewählt. Präparate aus Tieren, die eine höhere Dosis erhalten hatten, wurden mit entsprechend höheren Opioidkonzentrationen inkubiert.

Naloxon verhält sich gegenüber κ - bzw. μ -Rezeptoren mit unterschiedlicher Affinität (Schulz und Herz, 1976 b). Am unbehandelten GPI-Präparat sind höhere Naloxonkonzentrationen erforderlich, um die Hemmwirkung der κ -Ago-

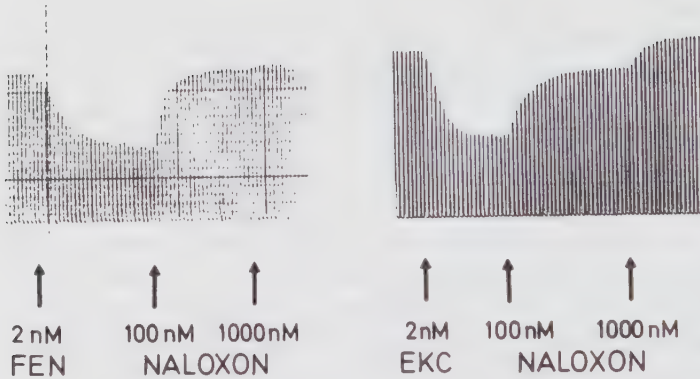


Abb. 8a

Einfluß der Naloxonkonzentration auf die Antagonisierung der Hemmwirkung von μ -Agonisten (Beispiel: Fentanyl (FEN) und κ -Agonisten (Beispiel: EKC) auf die elektrisch stimulierten Kontraktionen der GPI-Präparate.

nisten zu antagonisieren (Abb. 8a). Während 100 nM Naloxon ausreichen, um die Wirkung des μ -Agonisten Fentanyl unter den hier gewählten experimentellen Bedingungen aufzuheben, sind dazu bei dem κ -Agonisten EKC 1000 nM nötig. Analog dazu muß am chronisch opioidexponierten Meerschweinchenileum nach Reinkubation mit κ -Agonisten eine höhere Naloxondosis zu Präzipitation einer maximalen Entzugskontraktur verabreicht werden (Abb. 8b). Um sicherzugehen, daß bei der kompetitiven Verdrängung der κ -Agonisten alle besetzten Rezeptoren erfaßt werden, wurde schließlich bei allen Abhängigkeitsstudien 5 μ M Naloxon eingesetzt. Da gleiche Bedingungen vorliegen sollten, wurde diese Naloxonkonzentration sowohl nach Reinkubation mit κ - als auch mit μ -Agonisten verwendet.

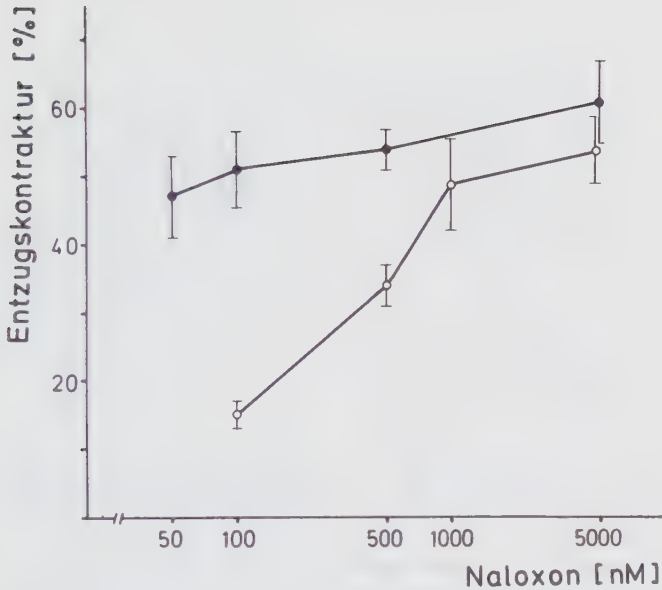


Abb. 8b

Einfluß der Naloxonkonzentration auf die Intensität der Entzugskontraktur nach Reinkubation mit μ ()- und κ ()-Agonisten. Ordinate: Entzugskontraktur ($\pm$ S.E.M.); Abszisse: für die Präzipitation des Entzugs verwendete Naloxonkonzentration (nM) (logarithmischer Maßstab). (Exp. Bed.: 10 μ g/h Fentanyl, in vitro 2 nM Fentanyl; 2 μ g/h MRZ 2549, in vitro 1 nM MRZ 2549).

2.1.2.4. Ergebnis

Abb. 9 zeigt die nach chronischer Opioidexposition über Opioidrezeptoren des Plexus myentericus präzipitierten Entzugskontrakturen. Der Abhängigkeitsgrad ist ausgedrückt als Prozentsatz der Entzugskontraktur (siehe 4.4.1.5.). Über einen Zeitraum von 6 Tagen wurden zwei

unterschiedliche Konzentrationen von Morphin, EKC oder MRZ 2549 mittels subkutan implantierter Minipumpen verabreicht (siehe 2.1.2.3.).

Chronische Infusion von 10 µg/h Morphin:

Die Längsmuskelpräparate wiesen einen relativ geringen Abhängigkeitsgrad auf. Nach Reinkubation mit Normorphin (150 nM) reagierten sie mit Entzugskontrakturen von etwa 30%. Reinkubation mit den κ -Opioiden Dynorphin A (1-13) (3nM) und α -Neo-Endorphin(1-8) (50 nM) führte zu einem überraschenden Befund: obwohl es sich um Präparate mit selektiv aktivierten μ -Rezeptoren handelte, wurden nach Reinkubation mit den genannten κ -Agonisten ebenso hohe Entzugskontrakturen wie nach Normorphin-Inkubation präzipitiert.

Chronische Infusion von 100 µg/h Morphin:

Der Abhängigkeitsgrad der GPI-Präparate war entsprechend höher. Nach Reinkubation mit Normorphin (800 nM) lagen die Entzugskontrakturen bei 80%. Reinkubation mit den κ -Agonisten Dynorphin A(1-13) (15 nM) und α -Neo-Endorphin(1-8) (300 nM) hatte - wie bereits bei chronischer Infusion von 10 µg/h Morphin gezeigt - Entzugskontrakturen ähnlicher Intensität wie nach Normorphin-Inkubation zur Folge.

Chronische Infusion des κ -Agonisten EKC (5 µg/h):

Der Abhängigkeitsgrad der Präparate war gering. Nach Reinkubation mit EKC (2 nM) sowie Dynorphin A(1-13) und α -Neo-Endorphin(1-8) (50 nM) reagierten die Präparate auf Naloxon mit Kontrakturen zwischen 30 und 40%. Eben- solche Kontrakturen wurden nach Reinkubation mit dem μ -Agonisten Normorphin (150 nM) registriert; in Betracht der selektiven chronischen Aktivierung der κ -Rezeptoren war dies ein unerwarteter Befund.

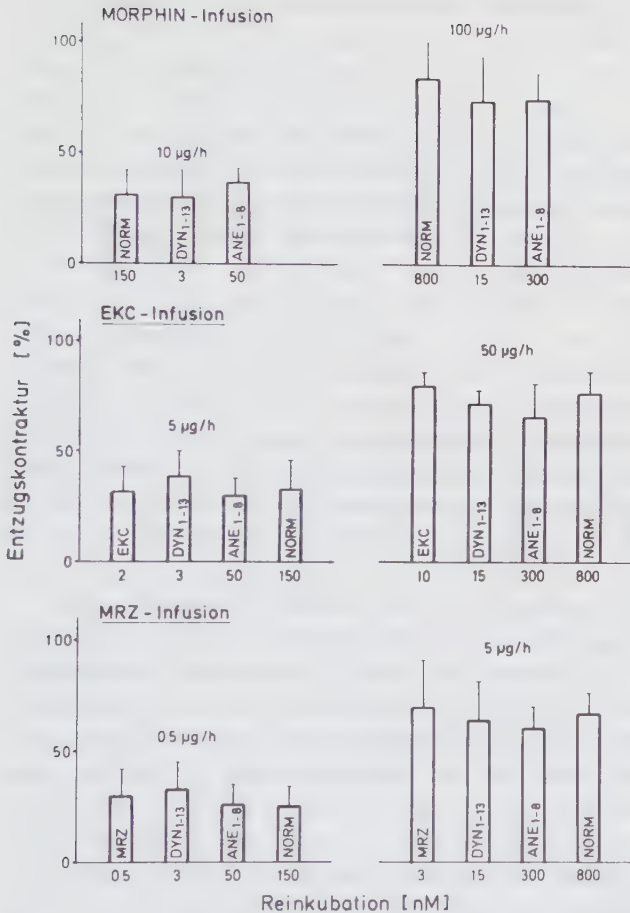


Abb. 9

Entzugskontrakturen chronisch opioidexponierter GPI-Präparate (Morphin: 10 µg und 100 µg/h; EKC: 5 µg und 50 µg/h; MRZ 2549: 0.5 µg und 5 µg/h) nach Reinkubation mit selektiven Agonisten. Ordinate: Entzugskontraktur (%+S.E.M.); Abszisse: für die Reinkubation verwendete Konzentrationen der Agonisten (nM): Normorphin (NORM), Dynorphin A(1-13) (DYN₁₋₁₃), α-Neo-Endorphin(1-8) (ANE₁₋₈), EKC, MRZ 2549.

Chronische Infusion von 50 µg/g EKC:

Die Präparate wiesen einen entsprechend höheren Abhängigkeitsgrad auf. Nach Reinkubation mit EKC (10 nM) sowie Dynorphin A(1-13) (15 nM) und α -Neo-Endorphin(1-8) (300 nM) löste Naloxon Entzugskontrakturen zwischen 65 und 80% aus. Mit Normorphin (800 nM) inkubierte Präparate reagierten mit Kontrakturen derselben Intensität; dieses Ergebnis bestätigte sich auch nach chronischer Infusion des κ -Agonisten MRZ 2549 (siehe unten).

Chronische Infusion des κ -Agonisten MRZ 2549 (0.5 µg/h):

Nach Reinkubation mit MRZ (0.5 nM) sowie Dynorphin A (1-13) (3 nM) und α -Neo-Endorphin(1-8) (50 nM) reagierten die Präparate entsprechend ihrem geringen Abhängigkeitsgrad mit Entzugskontrakturen von 25-30%. Die Kontrakturen nach Reinkubation mit dem μ -Agonisten Normorphin (150 nM) waren von derselben Intensität.

Chronische Infusion von 5 µg/h MRZ 2549:

Der Abhängigkeitsgrad der Präparate war erheblich höher. Reinkubation mit MRZ (3 nM) sowie Dynorphin A (1-13) (15 nM) und α -Neo-Endorphin(1-8) (300 nM) führte zu Entzugskontrakturen von 60-70%. Nach Reinkubation mit Normorphin (800 nM) löste Naloxon ebenso hohe Kontrakturen aus.

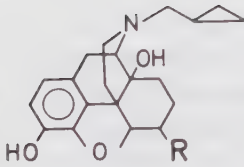
Zusammenfassend ist festzustellen, daß Naloxon an chronisch exponierten GPI-Präparaten - unabhängig von der Art und Dosis des chronisch verabreichten Opioids - sowohl nach Reinkubation mit μ - als auch mit κ -Agonisten Entzugskontrakturen präzipitierte. Aus diesen überraschenden Befunden kann gefolgert werden, daß sich die Abhängigkeit nicht nur an der mit selektiven Agonisten aktivierten Rezeptorpopulation, sondern auch über nicht chronisch aktivierte Opioidrezeptoren demonstrieren läßt.

2.1.3. Untersuchungen zur Opioidabhängigkeit nach selektiver Blockade von spezifischen Opioidrezeptoren

2.1.3.1. Vorbemerkungen

Bei den unter 2.1.2. beschriebenen Versuchen konnte eine Überlappung der am isolierten Organ eingesetzten Opioidagonisten auf die jeweils andere Opioidrezeptorpopulation nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Entzugskontraktur stellt einen sehr sensiblen Indikator für Abhängigkeitsentwicklung dar; je höher der Abhängigkeitsgrad eines Präparats ist, desto kleinere Mengen eines Agonisten am abhängigen Rezeptor reichen aus, um mit Naloxon eine Entzugskontraktur zu präzipitieren. So könnte bereits eine geringfügige Überlappung eines Agonisten auf die abhängige Rezeptorpopulation genügen, um über eine Interaktion mit diesen Rezeptoren die Auslösung des Abstinenzsymptoms zu ermöglichen. Die Selektivität der Reinkubation ist jedoch Voraussetzung für eine exakte Zuordnung der Entzugskontraktur zu einer bestimmten Rezeptorpopulation. Nachdem dies von grundlegender Bedeutung für den Aussagewert der Abhängigkeitsstudien ist, erschien es angebracht, die Problematik der Abhängigkeitsentwicklung unter modifizierten Bedingungen mit Hilfe anderer Techniken zu untersuchen. Der Versuchsaufbau wurde durch den Einsatz der alkylierenden Opioidantagonisten β -Funaltrexamin (β -FNA; Portoghese et al., 1980) und β -Chlornaltrexamin (β -CNA; Portoghese et al., 1978) erweitert. Mittels dieser Substanzen sollte jeweils eine der beiden funktionellen Opioidrezeptorpopulationen des GPI ausgeschaltet werden.

Bei β -FNA und β -CNA handelt es sich um Derivate des Opioidantagonisten Naltrexon (Abb. 10). Der Sauerstoff am C₆-Atom des Naltrexons wurde durch reaktionsfähige funktionelle Gruppen ersetzt. Sowohl β -FNA als auch β -CNA bewirken den Verlust der Funktionsfähigkeit von

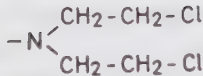


R: = O

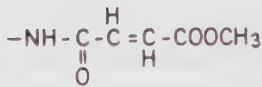
Naltrexon

- NH₂

Naltrexamin



β-Chlornaltrexamin
(β-CNA)

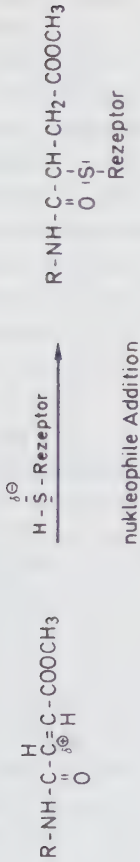


β-Funaltrexamin
(β-FNA)

Abb. 10

Opioidrezeptoren, indem sie die Bindungsstellen der Opioidrezeptormoleküle irreversibel, d.h. über die Ausbildung einer kovalenten Bindung, blockieren. In Abb. 11 sind die wahrscheinlichen Alkylierungsmechanismen der beiden Rezeptorblocker dargestellt. Von der Fumaramatmethylester-Gruppe des β-FNA wird angenommen, daß sie über eine nukleophile Additionsreaktion mit Sulfhydryl-Gruppen von Opioidrezeptoren eine kovalente Bindung eingeht; die Sulfhydryl-Gruppe agiert dabei als nukleophiler "Michael-Akzeptor", der an die aktivierte Doppelbindung des Fumaramatesters addiert (Takemori et al., 1981). Die Stickstoff-Lost-Gruppe des β-CNA rea-

a. β-FNA



b. β-CNA

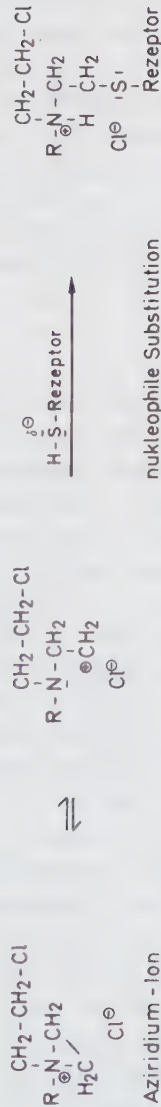


Abb. 11
 Wahrscheinliche Alkylierungsmechanismen von β-Funaltrexamin (β-FNA) (nach Takemori et al., 1981) und β-Chlor-naltrexamin (β-CNA) (nach Neumann, 1983, und Portoghese et al., 1979).

giert vermutlich in Form des hochreaktiven Aziridiums in einer nukleophilen Substitutionsreaktion mit Sulfhydrylgruppen des Opioidrezeptors (Portoghese et al., 1979). Während β -CNA besonders reaktionsfähig ist, besitzt β -FNA eine geringere Reaktionsfähigkeit, die jedoch mit einer ausgeprägten Rezeptorselektivität gepaart ist. β -FNA bewirkt eine irreversible, hochselektive antagonistische Blockade der μ -Rezeptoren und ist darüberhinaus durch eine reversible, opioidagonistische Wirkungskomponente an den κ -Rezeptoren gekennzeichnet (Portoghese et al., 1980; Takemori et al., 1981; Ward et al., 1982 a,b). Mit β -FNA behandelte GPI-Präparate enthalten aktive κ - bzw. inaktivierte μ -Rezeptoren. β -CNA alkyliert sowohl die μ - als auch die κ -Rezeptoren des GPI (Ward et al., 1982 a). Mit Hilfe reversibler, selektiver Liganden können die einzelnen Rezeptorpopulationen gegen die Alkylierung durch β -CNA geschützt werden ("selective protection"). Es ist auf diese Weise möglich, auch mit β -CNA Präparate mit weitgehend homogenen Rezeptoren zu gewinnen (Ward et al., 1982 a). Mit einem μ -Liganden geschützte Präparate enthalten nach β -CNA-Exposition noch aktive μ - und inaktivierte κ -Rezeptoren. Entsprechend erhält man homogene Präparate mit aktiven κ -Rezeptoren, wenn diese mit einem selektiven Liganden gegen die Alkylierung durch β -CNA geschützt werden. Da die selektive Blockade der μ -Rezeptorpopulation mit β -FNA keinen Schutzliganden für die κ -Rezeptoren erfordert, ist das selektive β -FNA zur Ausschaltung der μ -Rezeptoren dem β -CNA vorzuziehen. Die Blockade der κ -Rezeptoren ist dagegen nur mit β -CNA möglich, wobei die μ -Rezeptoren effektiv geschützt werden müssen.

Grundsätzlich sind an derartig vorbehandelten GPI-Präparaten ausgelöste Entzugskontraktionen der jeweils noch aktiven Rezeptorpopulation zuzuordnen. So kann nach vollzogener Blockade der μ -Rezeptoren durch β -FNA eine

Entzugskontraktur nach Reinkubation mit κ -Agonisten eindeutig auf abhängige κ -Rezeptoren zurückgeführt werden; nach Reinkubation mit μ -Agonisten ist dagegen nicht mit einer Entzugskontraktur zu rechnen, es sei, der μ -Agonist interagiert - infolge mangelnder Selektivität - mit nicht blockierten Rezeptoren. Wurden die κ -Rezeptoren mit Hilfe von β -CNA ausgeschaltet, so ist eine Entzugskontraktur nach Reinkubation mit μ -Agonisten wahrscheinlich durch die Existenz abhängiger μ -Rezeptoren bedingt. Nach Reinkubation mit einem κ -Agonisten ist kein Abstinenzsymptom zu erwarten, wenn nicht der κ -Agonist mit nicht blockierten (μ -)Rezeptoren interagiert.

2.1.3.2. Versuchsschema (β -FNA)

Abb. 12 zeigt am Beispiel eines μ -toleranten Präparates den Aufbau des durch den Einsatz von β -FNA erweiterten Versuchsschemas:

1 Demaskierung der Rezeptoren

Vor der Alkylierung der μ -Rezeptoren durch β -FNA ist es erforderlich, den chronisch infundierten μ -Agonisten von den Rezeptoren zu entfernen; um eine unterschiedliche Behandlung κ -toleranter Präparate zu vermeiden, wurden auch sie vor der Inkubation mit β -FNA gewaschen.

2 Inkubation mit β -FNA

Die μ -Rezeptoren werden durch β -FNA alkyliert. Um eine vollständige Blockade der μ -Rezeptoren bzw. eine maximale β -FNA-Wirkung zu erzielen, muß eine ausreichende β -FNA-Konzentration über einen erforderlichen Zeitraum eingesetzt werden.

3 Entfernung des reversibel interagierenden β -FNA

Nach vollzogener Alkylierung der μ -Rezeptoren ist das

μ -tolerantes Präparat

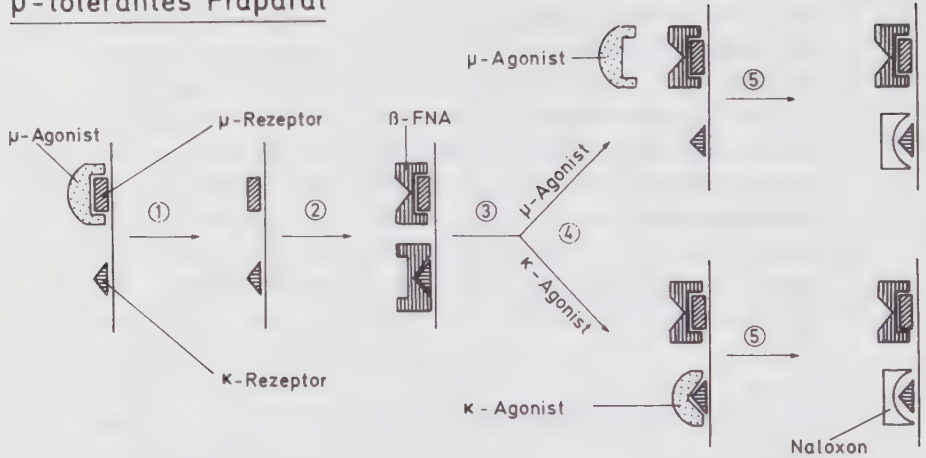


Abb. 12

Erweitertes Versuchsschema (β -FNA) am Beispiel eines Präparates mit chronisch aktivierten μ -Rezeptoren. Schritte: Demaskierung der Rezeptoren (1), Inkubation mit β -FNA (2), Entfernung des reversibel interagierenden β -FNA (3), Reinkubationsphase (4), präzipitierter Entzug (5).

mit den κ -Rezeptoren interagierende β -FNA auszuwaschen, da vor der Reinkubation sämtliche aktive Rezeptoren in demaskiertem Zustand vorliegen müssen (siehe 2.1.2.2.).

4 Reinkubationsphase (siehe 2.1.2.2.)

5 Präzipitierter Entzug (siehe 2.1.2.2.)

Entzugskontrakturen mit β -FNA behandelter Präparate sind auf die noch aktiven (κ -)Rezeptoren zurückzuführen.

2.1.3.3. Versuchsbedingungen (β -FNA)

Für die chronische Opioidinfusion in vivo wurden der μ -Agonist Fentanyl, der in Bezug auf Wirkungsstärke und Rezeptoraffinität dem Morphin überlegen ist, sowie die κ -Agonisten MRZ 2549 und EKC verwendet. Beim Versuchsablauf in vitro war aus bereits erwähnten Gründen (siehe 2.1.2.3.) darauf zu achten, möglichst kurze Inkubations- bzw. Auswaschzeiten festzulegen.

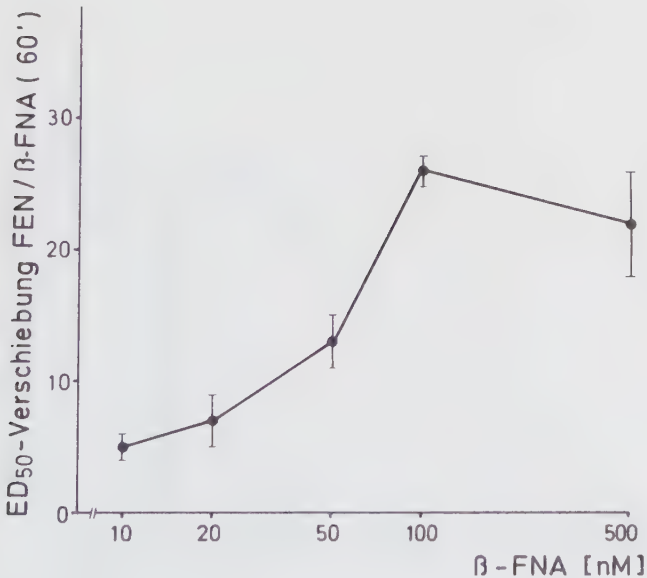


Abb. 13

Einfluß der β -FNA-Konzentration auf die Verschiebung der ED₅₀ des μ -Agonisten Fentanyl (FEN) an GPI-Präparaten bei einer Einwirkungszeit von 60 min. Ordinate: ED₅₀ FEN vor β -FNA-Exposition ($\pm$ S.E.M.); Abszisse: Konzentration von β -FNA (nM) (logarithmischer Maßstab).

(Die für eine maximale Blockade der μ -Rezeptoren erforderliche β -FNA-Konzentration und die entsprechende Inkubationszeit wurden am unbehandelten GPI ermittelt. Als Parameter für die alkylierende β -FNA-Wirkung diente die Verschiebung der ED_{50} des μ -Agonisten Fentanyl. Eine Konzentration von 100 nM β -FNA bei einer Einwirkungszeit von 60 Minuten erwies sich als ausreichend (Abb. 13, 14). Unter diesen Bedingungen vergrößerte sich die ED_{50} von Fentanyl etwa um das Dreißigfache, während die Präparate gegenüber κ -Agonisten wie Dynor-

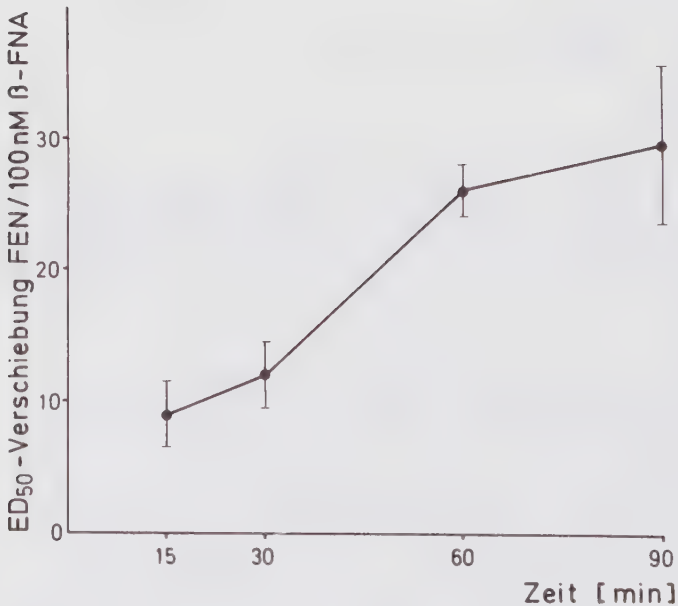


Abb. 14
Einfluß der Einwirkungszeit von 100 nM β -FNA auf die Verschiebung der ED_{50} des μ -Agonisten Fentanyl (FEN) an GPI-Präparaten. Ordinate: ED_{50} nach β -FNA-Exposition / ED_{50} vor β -FNA-Exposition ($\pm$ S.E.M.); Abszisse: Dauer der β -FNA-Exposition (min).

phin A, EKC, MRZ 2549 und U-50,488 nicht unempfindlicher wurden (Abb. 15). Diese Befunde sind in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Autoren (Takemori et al., 1981; Ward et al., 1982 b), die zeigten, daß β -FNA an isolierten Organpräparaten (GPI, MVD) zwar eine konzentrations- und zeitabhängige Hemmung der Morphinwirkung hervorruft, die Dosis-Wirkungskurve jedoch nur begrenzt und auf parallele Weise nach rechts verschiebt; höhere β -FNA-Konzentrationen bzw. längere Einwirkungszeiten führen weder zu einer weiteren Verschiebung noch zu einem Abflachen der Dosis-Wirkungskurve von μ -Agonisten. Die maximale Wirkungsstärke wird also nicht beeinträchtigt.

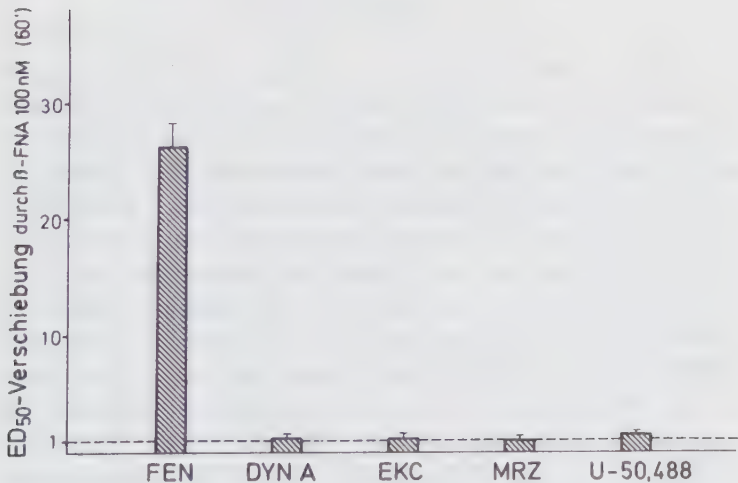


Abb. 15
Einfluß von β -FNA (100 nM/60 min) auf die ED₅₀-Verschiebung von μ - und κ -Agonisten an GPI-Präparaten. Ordinate: ED₅₀ nach β -FNA-Exposition / EC₅₀ vor β -FNA-Exposition ($\pm$ S.E.M.); Abszisse: getestete Agonisten (μ -Agonist: Fentanyl (FEN); κ -Agonisten: Dynorphin A (DYN A), EKC, MRZ 2549, U-50,488).

Um herauszufinden, über welche Rezeptoren die μ -Agonisten nach der Blockade der μ -Rezeptoren ihren Effekt vermitteln, wurde der K_e -Wert von Fentanyl gegen Naloxon an Kontrollpräparaten und nach Behandlung durch β -FNA bestimmt und mit den K_e -Werten von κ -Agonisten verglichen. Der K_e -Wert mit Naloxon gibt Aufschluß über die Interaktion verschiedener Opiode mit spezifischen Opioidrezeptorpopulationen (Kosterlitz und Watt, 1968).

Es gilt die Beziehung

$$K_e = \frac{a}{DR - 1}$$

$$DR = \frac{ED_{50} \text{ des Agonisten in Gegenwart des Antagonisten}}{ED_{50} \text{ des Agonisten in Abwesenheit des Antagonisten}}$$

$$a = \text{molare Konzentration des Antagonisten}$$

Ein hoher K_e -Wert drückt eine geringe Affinität des Antagonisten für einen bestimmten Opioidrezeptortyp aus, während ein niedriger K_e -Wert auf eine hohe Affinität des Antagonisten zu dem betreffenden Rezeptor schließen läßt (Kosterlitz und Watt, 1968). Tabelle 1 zeigt eine Aufstellung der K_e -Werte von Fentanyl und EKC an Kontrollpräparaten und nach Behandlung mit β -FNA. Für den κ -Agonisten EKC wurde derselbe K_e -Wert wie für den hochselektiven κ -Agonisten U-50,488 (Von Voigtlander, 1981, 1983) ermittelt. Nach β -FNA-Behandlung der Präparate blieb dieser Wert unverändert, was darauf zurückzuführen sein dürfte, daß EKC jeweils mit denselben Rezeptoren interagiert. Der K_e -Wert des μ -Agonisten Fentanyl erhöhte sich dagegen infolge der β -FNA-Exposition der Präparate etwa um den Faktor 10. Darüberhinaus lag dieser K_e -Wert von Fentanyl auch signifikant über dem für EKC ermittelten Wert ($p < 0.01$). Dies deutet darauf hin, daß sich Fentanyl nach Blockade der μ -Rezeptoren nicht denjenigen κ -Rezeptoren zuwendet, mit denen prototypische κ -Agonisten wie EKC und U-50,488

interagieren. Es könnte sich jedoch um einen Subtyp der κ -Rezeptorpopulation handeln.

Tabelle 1

Einfluß der β -FNA-Exposition auf die Naloxon- K_e -Werte (K_e , nM $\pm$ S.E.M.) von μ - und κ -Agonisten am Längsmuskelpräparat des Meerschweinchenileums

	Fentanyl	EKC	U-50,488
Kontrolle	3.2 ($\pm$ 0.8)	12.5 ($\pm$ 0.8)	12.2 ($\pm$ 2.5)
β -FNA-Behandlung	31.8 ($\pm$ 4.2)	12.7 ($\pm$ 1.7)	

Die zur Entfernung des agonistisch-reversibel interagierenden β -FNA-Anteils erforderliche Auswaschzeit wurde am chronisch exponierten GPI ermittelt. Als Indiz für die Anwesenheit von β -FNA an κ -Rezeptoren diente die durch Naloxon präzipitierte Entzugskontraktur; aufgrund der hohen Affinität der agonistischen β -FNA-Komponente erwies sich eine Auswaschzeit von 90 Minuten als unerlässlich (Abb. 16).

Als Agonisten für die Reinkubation fanden Fentanyl, EKC, MRZ und Dynorphin A Verwendung. Es wurden drei unterschiedliche Konzentrationen der jeweiligen Agonisten eingesetzt; die mittlere Konzentration lag im ED_{50} -Bereich der Agonisten am unbehandelten GPI. Auf diese Weise sollte die Selektivität der einzelnen Konzentrationen bzw. deren Einfluß auf die Intensität der Entzugskontraktur überprüft werden.

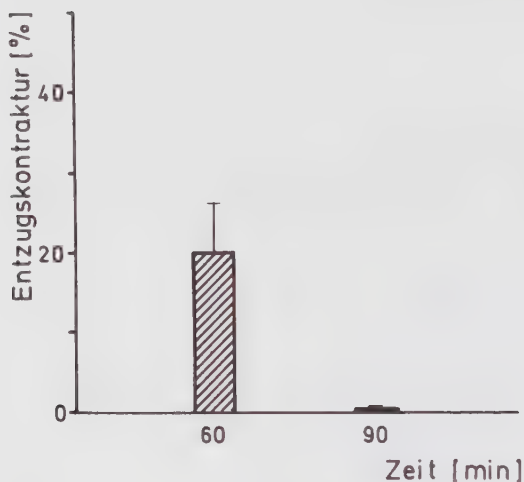


Abb. 16

Erforderliche Auswaschzeit zur Entfernung des agonistisch-reversibel interagierenden β -FNA-Anteils (Indikator der Anwesenheit von β -FNA: durch Naloxon präzipitierbare Entzugskontraktur chronisch opioidexponierter GPI-Präparate). Ordinate: Entzugskontraktur (% + S.E.M.); Abszisse: getestete Waschzeiten (min). (Exp. Bed.: 10 μ g/h Fentanyl)

Ein Teil der chronisch infundierten Präparate diente als Kontrollen, die mit Ausnahme der β -FNA-Exposition derselben Prozedur unterworfen waren.

2.1.3.4. Ergebnis (β -FNA)

Die durch β -FNA bedingte längere Versuchsdauer hatte zur Folge, daß im Vergleich zu den unter 2.1.2. beschriebenen Ergebnissen Entzugskontrakturen geringerer Intensität zu verzeichnen waren.

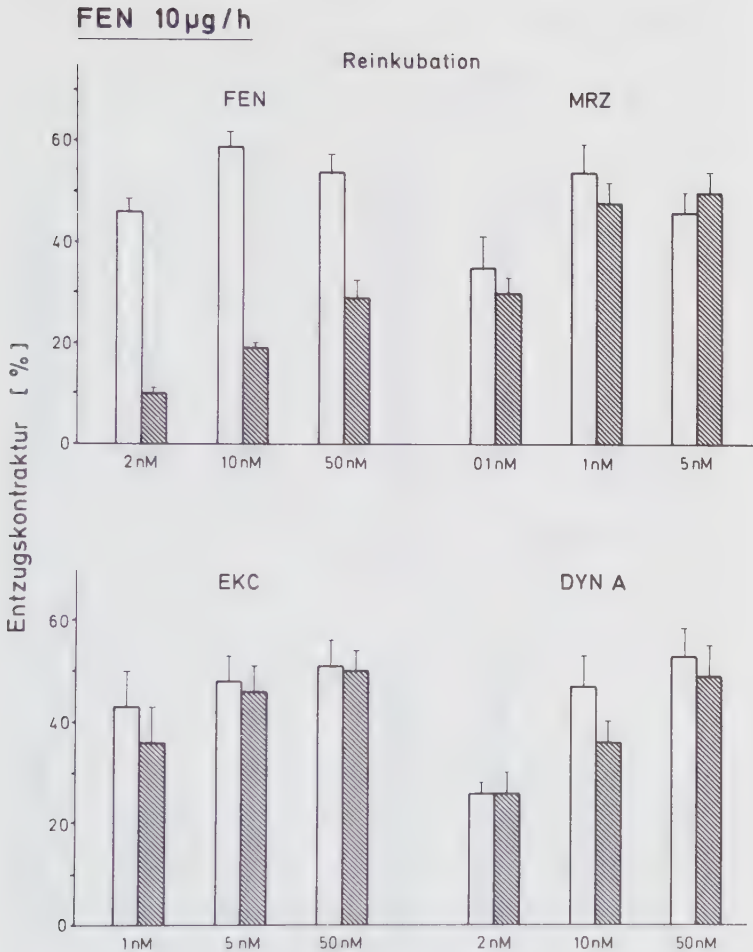


Abb. 17

Entzugskontraktoren chronisch mit Fentanyl (FEN, 10 $\mu\text{g/h}$) exponierter GPI-Präparate nach Reinkubation mit selektiven Agonisten. Die schraffierten Säulen stellen die mit β -FNA behandelten Präparate, die leeren Säulen die Kontrollpräparate dar. Ordinate: Entzugskontraktur (% + S.E.M.); Abszisse: Konzentrationen der für die Reinkubation verwendeten Agonisten (nM) (μ -Agonist: Fentanyl (FEN), κ -Agonisten: MRZ 2549, EKC, Dynorphin A (DYN A)).

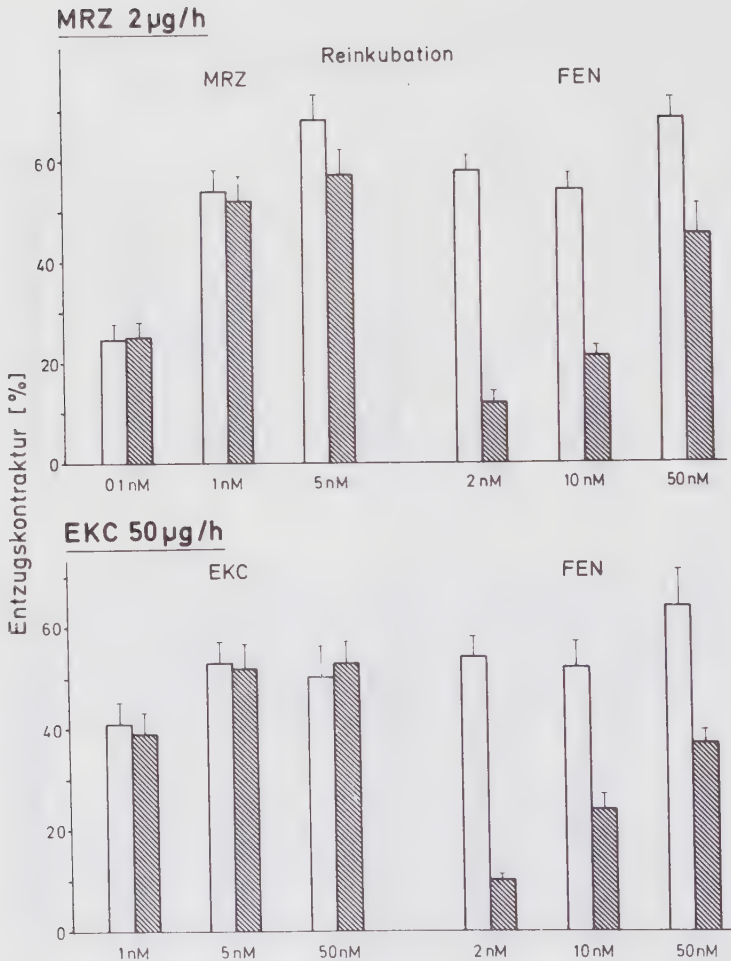


Abb. 18

Entzugskontraktoren chronisch mit κ -Agonisten (MRZ 2549 2 µg/h; EKC 50 µg/h) exponierter GPI-Präparate nach Reinkubation mit selektiven Agonisten. Die schraffierten Säulen stellen die mit 8-FNA behandelten Präparate, die leeren Säulen die Kontrollpräparate dar. Ordinate: Entzugskontraktur (% + S.E.M.); Abszisse: Konzentrationen der für die Reinkubation verwendeten Agonisten (nM) (κ -Agonisten: EKC, MRZ 2549; μ -Agonist: Fentanyl (FEN)).

In Abb. 17 sind die Entzugskontraktionen von Präparaten nach chronischer Infusion von Fentanyl (10 $\mu\text{g/h}$) dargestellt. Die Kontrollpräparate lieferten nach Reinkubation mit Fentanyl Entzugskontraktionen um 50%. Die Blockade der μ -Rezeptoren durch β -FNA führte zu signifikant reduzierten Kontraktionen, deren Intensität mit steigender Fentanylkonzentration zunahm. Reinkubation mit 2 nM Fentanyl bewirkte Kontraktionen um 10% ($p < 0.001$), 10 nM Fentanyl hatten Kontraktionen um 20% ($p < 0.001$), 50 nM Fentanyl Kontraktionen um 30% ($p < 0.01$) zur Folge.

Nach Reinkubation dieser Präparate mit den κ -Agonisten MRZ 2549 (0.1, 1.0, 5.0 nM), EKC (1.0, 5.0, 50 nM) und Dynorphin A (2.0, 10, 50 nM) präzipitierte Naloxon sowohl an Kontrollpräparaten als auch nach β -FNA-Exposition Entzugskontraktionen um 50%. Bei der jeweils niedrigsten Inkubationskonzentration von MRZ 2549 (0.1 nM) und Dynorphin A (2.0 nM) wurden im Vergleich zu höherinkubierten Präparaten signifikant geringere Entzugskontraktionen registriert; dasselbe Phänomen war auch bei chronisch mit κ -Agonisten infundierten Tieren zu beobachten (Abb. 18).

Abb. 18 zeigt die Entzugskontraktionen der Längsmuskelpräparate nach chronischer Infusion der κ -Agonisten MRZ 2549 (2 $\mu\text{g/h}$) und EKC (50 $\mu\text{g/h}$). Nach Reinkubation mit MRZ (1.0, 5.0 nM) und EKC (1.0, 5.0, 50 nM) konnten sowohl nach Behandlung der Präparate mit β -FNA als auch bei den Kontrollen Entzugskontraktionen von etwa 50 bis 60% präzipitiert werden. Nach Reinkubation mit 0.1 nM MRZ löste der Entzug durch Naloxon - wohl infolge zu geringer Agonistenkonzentrationen (siehe oben) - erheblich schwächere Kontraktionen von etwa 25% aus.

Reinkubation dieser Präparate mit Fentanyl (2.0, 10, 50 nM) führte bei den Kontrollpräparaten zu ebenso intensiven Entzugskontraktionen wie nach Inkubation mit

MRZ bzw. EKC. Blockade der μ -Rezeptoren hatte - wie bei chronisch mit Fentanyl infundierten Präparaten - signifikant reduzierte Kontrakturen zur Folge, deren Intensität mit steigender Fentanylkonzentration zunahm (Abb. 18).

Die Ausschaltung der μ -Rezeptoren mit β -FNA beeinflusste die Intensität der Entzugskontrakturen nach Reinkubation mit κ -Agonisten weder bei chronisch mit Fentanyl noch bei chronisch mit κ -Agonisten infundierten Präparaten. Dieser Befund dokumentiert die Beteiligung nicht chronisch aktivierter κ -Rezeptoren am Abhängigkeitsgeschehen auch in jenen Präparaten, in denen allein die μ -Rezeptorpopulation selektiv aktiviert wurde. Andererseits bewirkte β -FNA nicht nur nach chronischer Exposition der μ -Rezeptoren, sondern auch nach selektiver Aktivierung der κ -Rezeptoren reduzierte Entzugskontrakturen nach Reinkubation mit Fentanyl. Daraus läßt sich schließen, daß - unabhängig von der Rezeptorspezifität des chronisch verabreichten Opioids - die nach Fentanylinkubation an intakten Präparaten (Kontrollen) präzipitierte Entzugskontraktur jeweils auf - an der Abhängigkeitsentwicklung beteiligte - μ -Rezeptoren zurückzuführen ist. Demnach enthalten GPI-Präparate neben κ -Rezeptoren, die chronisch und selektiv aktiviert wurden, auch "abhängige" μ -Rezeptoren, die jedoch nicht chronisch aktiviert wurden. Grundsätzlich bestätigten diese Befunde die in 2.1.2. aufgeführten Ergebnisse.

2.1.3.5. Versuche mit β -CNA

Nachdem mit Hilfe von β -FNA der Abhängigkeitsgrad von Längsmuskelpräparaten nach Blockade der μ -Rezeptoren untersucht worden war, sollten analoge Studien nach Blockade der κ -Rezeptorpopulation durchgeführt werden. Eine entsprechende Versuchsanordnung, die den Einsatz

κ - tolerantes Präparat

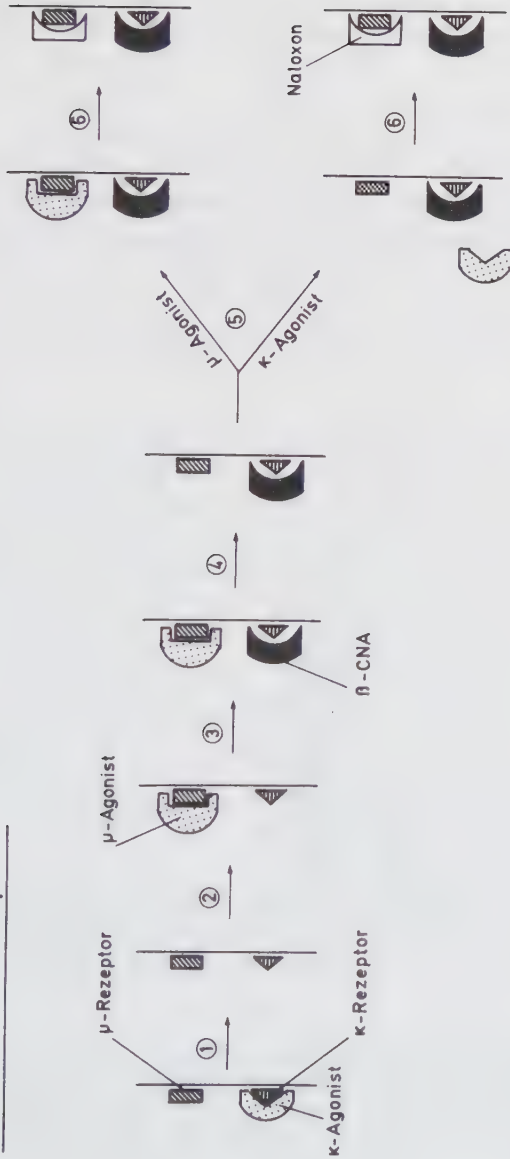


Abb. 19
Erweitertes Versuchsschema (β -CNA) am Beispiel eines Präparates mit chronisch aktivierten κ -Rezeptoren. Schritte: Demaskierung der κ -Rezeptoren (1), Inkubation mit einem Schutzliganden (2), Inkubation mit β -CNA (3), Entfernung des Schutzliganden (4), Reinkubationsphase (5), präzipitierter Entzug (6).

von β -CNA und eines Schutzliganden für die μ -Rezeptoren (siehe 2.1.3.1.) umfaßt, ist in Abb. 19 am Beispiel eines Präparates mit chronisch aktivierten κ -Rezeptoren dargestellt. Sie besteht aus 6 Schritten:

1 Demaskierung der κ -Rezeptoren

Nach dem Einbringen des Längsmuskelpräparates in das Organbad befindet sich der in vivo chronisch infundierte κ -Agonist noch an den κ -Rezeptoren (siehe 2.1.2.2.). Um die Alkylierung der κ -Rezeptoren durch β -CNA zu ermöglichen, müssen diese Rezeptoren in demaskiertem Zustand vorliegen. Zur Entfernung des chronisch verabreichten Opioids werden die Präparate gewaschen (siehe 2.1.2.3.).

2 Inkubation mit einem Schutzliganden

Sinn der Prozedur ist es, die κ -Rezeptorpopulation durch β -CNA auszuschalten und die μ -Rezeptoren im aktiven Zustand zu erhalten. Das reaktionsfähige β -CNA alkyliert jedoch sowohl die κ - als auch die μ -Rezeptoren des Plexus myentericus. Um die μ -Rezeptoren gegen die Blockade durch β -CNA zu schützen, werden die Präparate 10 Minuten vor der Exposition gegenüber β -CNA mit einem μ -Agonisten inkubiert. Dieser wird in einer Konzentration zugesetzt, welche den effektiven Schutz der μ -Rezeptoren gewährleistet, ohne zu einer gleichzeitigen "cross protection" der κ -Rezeptoren zu führen.

3 Inkubation mit β -CNA

In dieser Phase erfolgt die irreversible Blockade der κ -Rezeptoren; die geschützten μ -Rezeptoren bleiben aktiv.

4 Entfernung des Schutzliganden

Damit für die Reinkubation demaskierte Rezeptoren vorliegen (siehe 2.1.2.2.), wird der zum Schutz der μ -Rezeptoren verwendete Ligand ausgewaschen.

5 Reinkubationsphase (siehe 2.1.2.2.)

6 Präzipitierter Entzug

Entzugskontrakturen dieser Präparate sind auf die noch aktiven (μ -) Rezeptoren zurückzuführen.

Als Schutzliganden für die μ -Rezeptoren kamen Morphin bzw. Normorphin nicht in Frage, da insbesondere Normorphin zum effektiven Schutz der μ -Rezeptoren in einer

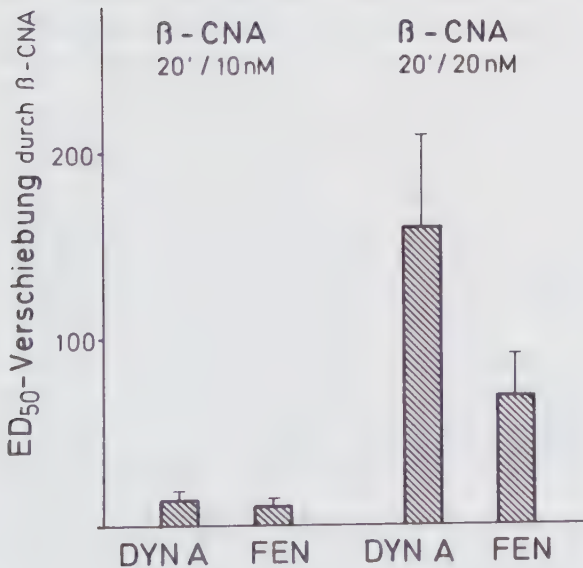


Abb. 20
Einfluß von 10 nM und 20 nM β -CNA bei einer Einwirkungszeit von 20[auf die ED₅₀-Verschiebung von Dynorphin A (DYN A) und Fentanyl (FEN) an GPI-Präparaten. Ordinate: ED₅₀ nach β -CNA-Exposition/ED₅₀ vor β -CNA-Exposition (+ S.E.M.); Abszisse: getestete Agonisten.

Konzentration zugesetzt werden muß, die gleichzeitig auch die κ -Rezeptoren miterfaßt ("cross protection"; Chavkin et al., 1982).

Fentanyl erwies sich dagegen als geeignet, die Alkylierung der μ -Rezeptoren durch das hochaffine und reaktionsfähige β -CNA zu verhindern. Bei einer Inkubationszeit von 20 Minuten, die für eine effektive β -CNA-Wirkung ausreicht (Chavkin und Goldstein, 1981), wurde eine Konzentration von 20 nM β -CNA eingesetzt. Abb. 20 zeigt die Verschiebung der ED_{50} -Werte von Dynorphin A und Fentanyl am unbehandelten GPI nach der Inkubation mit 10 bzw. 20 nM β -CNA über einen Zeitraum von 20 Minuten. Gegenüber relativ geringfügigen Veränderungen durch 10 nM β -CNA verschoben sich die ED_{50} -Werte nach Inkubation mit 20 nM um den Faktor 150 bei Dynorphin A

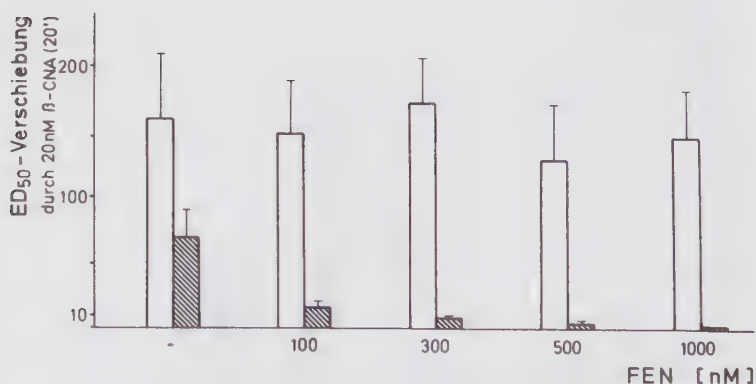


Abb. 21

Einfluß unterschiedlich hoher Fentanylkonzentrationen auf die ED_{50} -Verschiebung von Dynorphin A (leere Säulen) und Fentanyl (schraffierte Säulen) durch β -CNA (20 nM/ 20 min). Ordinate: ED_{50} nach β -CNA-Exposition / ED_{50} vor β -CNA-Exposition ($\pm$ S.E.M.); Abszisse: Konzentration des als Schutzliganden verwendeten Fentanyls (nM).

bzw. um den Faktor 60 bis 80 bei Fentanyl. Unter den gewählten Bedingungen (20 nM β -CNA/20 Minuten) mußten zum Schutz der μ -Rezeptoren 500 nM Fentanyl eingesetzt werden; diese Konzentration entspricht etwa der hundertfachen ED_{50} von Fentanyl am unbehandelten GPI. In Abb. 21 ist der Einfluß verschiedener Fentanylkonzentrationen auf die Verschiebung der ED_{50} bzw. auf die Alkylierung der Rezeptoren von Dynorphin und Fentanyl durch β -CNA dargestellt. Während die ED_{50} des κ -Agonisten Dynorphin A trotz Fentanylinkubation durch β -CNA um mehr als das Hundertfache verschoben wird, bleibt die ED_{50} von Fentanyl bzw. die Aktivität der μ -Rezeptoren bei Fentanylkonzentrationen von 500 und 1000 nM weitgehend erhalten.

Es bereitete Schwierigkeiten, das lipophile Fentanyl in der für den Schutz der μ -Rezeptoren erforderlichen hohen Konzentration (500 nM) vollständig aus dem Gewebe zu entfernen. Am chronisch opioidexponierten GPI (10 μ g/h Fentanyl bzw. 50 μ g/h U-50,488) präzipitierte Naloxon selbst nach einer intensiven Waschprozedur von 180 Minuten noch Entzugskontrakturen, die auf die Anwesenheit von Fentanyl im Gewebe bzw. an den Rezeptoren zurückzuführen waren (Abb. 22). Wie bereits erwähnt, wirkt sich jedoch zu langes und intensives Waschen chronisch opioidexponierter Präparate in einer verminderten Entzugskontraktur des Längsmuskels aus (siehe 2.1.2.3.); eine 3 Stunden überschreitende Auswaschzeit erwies sich daher als ungünstig.

Durch das im Gewebe verbliebene Fentanyl war die eindeutige Zuordnung einer mit Hilfe von Naloxon präzipitierten Entzugskontraktur zu einer bestimmten Rezeptorpopulation nicht in jedem Fall möglich. Eine zuverlässige Aussage über den abhängigen Zustand einer Opioidrezeptorpopulation des Plexus myentericus ist nur zu treffen, wenn die kompetitive Verdrängung eines selek-

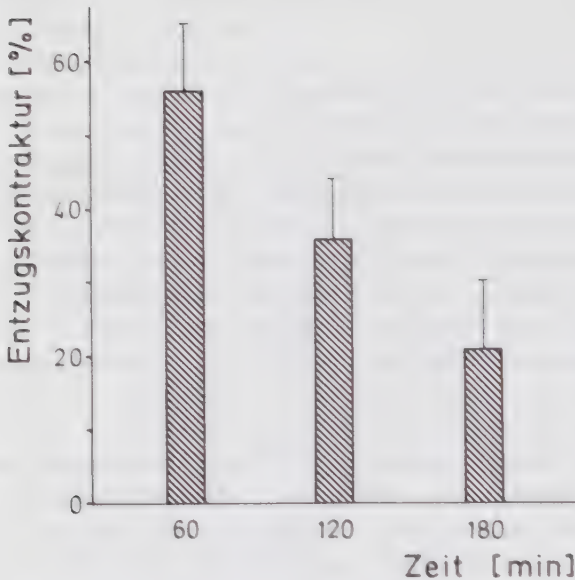


Abb. 22

Ermittlung der zur Entfernung des Schutzliganden Fentanyl aus dem chronisch opioidexponierten GPI erforderlichen Auswaschzeit (Indikator für die Anwesenheit von Fentanyl: durch Naloxon präzipitierbare Entzugskontraktur ($\bar{x}$ + S.E.M.)); Abszisse: getestete Waschzeiten (min). (Exp. Bed.: Fentanyl 10 μ g)

tiven Agonisten durch das relativ unselektive Naloxon eine Entzugskontraktur auslöst. Die Entzugskontraktur wird dem Rezeptortyp zugeordnet, mit dem der selektive Agonist interagiert. Befinden sich zum Zeitpunkt des Entzugs an beiden Rezeptorpopulationen Agonisten, ist eine exakte Korrelation der Entzugskontraktur mit einer bestimmten Rezeptorpopulation nicht möglich (siehe 2.1.2.2.). Löst Naloxon nach Blockade der κ -Rezeptoren mit β -CNA und anschließender Reinkubation mit einem κ -Agonisten eine Entzugskontraktur aus, so kann diese so-

wohl auf einer Interaktion des κ -Agonisten mit nicht blockierten (μ)-Rezeptoren als auch auf einer Interaktion des Schutzliganden Fentanyl mit μ -Rezeptoren beruhen. In Anbetracht der hier dargestellten technischen Schwierigkeiten wurde auf die Durchführung der geplanten Versuche mit β -CNA verzichtet.

2.1.4. In-vivo-Infusion von Opioiden

2.1.4.1. Vorbemerkungen

Die Dosis des in vivo verabreichten Opioids ist entscheidend für die selektive Aktivierung einer bestimmten Rezeptorpopulation. Selbst bei der Infusion eines selektiven Opioids sind aufgrund zu hoher Konzentrationen Überlappungen auf den anderen Rezeptortyp denkbar. So könnte infolge einer zu hohen Infusionsdosis auch der andere Rezeptortyp chronisch aktiviert bzw. abhängig werden, während sich bei einer niedrigeren Infusionsdosis selektive Abhängigkeit entwickeln sollte. Um definitiv aussagen zu können, daß trotz selektiver chronischer Aktivierung eines bestimmten Rezeptortyps auch die andere - nicht aktivierte - Rezeptorpopulation in die Abhängigkeitsentwicklung mit- einbezogen wird, mußten zwei Fragen beantwortet werden:

1. Ist davon auszugehen, daß die chronisch infundierte Opioiddosis die selektive Aktivierung einer spezifischen Opioidrezeptorpopulation des Plexus myentericus gewährleistet?
2. Welchen Einfluß hat die Infusionsdosis auf die Abhängigkeitsentwicklung im Plexus myentericus?

Zur Klärung dieser Fragen wurde die Fentanylkonzentration im Serum chronisch infundierter Tiere am Versuchstag radioimmunologisch gemessen; außerdem wurde der Einfluß sehr niedriger und höherer chronischer Infusionskonzentrationen auf die Abhängigkeitsentwicklung der

myenterischen Opioidrezeptoren untersucht.

2.1.4.2. Fentanylserumgehalt nach niedrig- und hochdosierter Fentanylinfusion

In der Tabelle 2 sind die am Versuchstag ermittelten Fentanylserumkonzentrationen von Tieren dargestellt, denen über einen Zeitraum von 6 Tagen 2 µg/h bzw. 10 µg/h Fentanyl verabreicht worden war. Diese Konzentrationen liegen innerhalb der Größenordnung, in der Fentanyl am isolierten Ileum eine 50%ige Hemmung der elektrisch stimulierten Kontraktionen hervorruft.

Tabelle 2

Fentanylserumgehalt chronisch infundierter Meerschweinchen am Versuchstag (Radioimmunoassay)

	chronische Infusion (6 Tage)	
	Fentanyl 2 µg/h	Fentanyl 10 µg/h
fmol/ µl Serum	1.7	19
(=nM)		
(+ S.E.M.)	(+ 0.3)	(+ 2.4)

Die Konzentration am Wirkort (Plexus myentericus) beträgt möglicherweise nur einen Bruchteil des im Blut befindlichen Fentanyls, da ein erheblicher Teil des lipophilen Opioids im Serum an Proteine gebunden vorliegt (70% Proteinbindung im menschlichen Plasma; Höllt und Teschemacher, 1975). Der hohe Verteilungskoeffizient des Fentanyls (19.3 im Heptan/Phosphatpuffersystem;

Wüster, 1978) begünstigt darüberhinaus eine Anreicherung in Lipidmembranen und Fettgewebe (Hess et al., 1971). Bei den Versuchen mit β -CNA am isolierten Ileum (2.1.3.5.) wurde gezeigt, daß selbst bei Konzentrationen bis zu 1000 nM Fentanyl die Blockade der κ -Rezeptoren durch β -CNA nicht verhindert wird; dies läßt auf eine hohe Rezeptorselektivität von Fentanyl schließen. Darüberhinaus wurde am fentanyltoleranten GPI in Anwesenheit von 10 nM Fentanyl in vitro keine Beeinträchtigung der Empfindlichkeit der κ -Rezeptoren beobachtet (Schulz et al., 1981 c).

Es ist daher anzunehmen, daß sich die infolge chronischer Infusion erreichte Konzentration von Fentanyl im Plexus myentericus durchaus innerhalb der Grenzen befindet, in denen eine selektive Interaktion dieses Opioids mit den μ -Rezeptoren gewährleistet ist.

2.1.4.3. Intensität der (Kreuz-)Abhängigkeitsentwicklung nach niedrig- und hochdosierter Opioidinfusion

In Abb. 23 sind die Ergebnisse der Abhängigkeitsstudien an Darmpräparaten nach unterschiedlich hoher chronischer Opioidinfusion dargestellt. Die Untersuchungen erfolgten nach dem modifizierten Schema mit β -FNA (siehe 2.1.3.2.). Für die in-vivo-Infusion fanden das als besonders selektiver κ -Agonist beschriebene Benzenacetamid-Derivat U-50,488 (Von Voigtlander et al., 1981; 1983) sowie der μ -Agonist Fentanyl Verwendung. Bei der Reinkubation wurden - unabhängig von der Infusionsdosis - jeweils dieselben Konzentrationen von U-50,488 (10 nM) bzw. Fentanyl (2 nM) eingesetzt.

Nach chronischer Infusion von 2 μ g/h Fentanyl wurde nur eine geringfügige Abhängigkeitsentwicklung beobachtet. Tatsächlich unterschieden sich die an diesen Präparaten

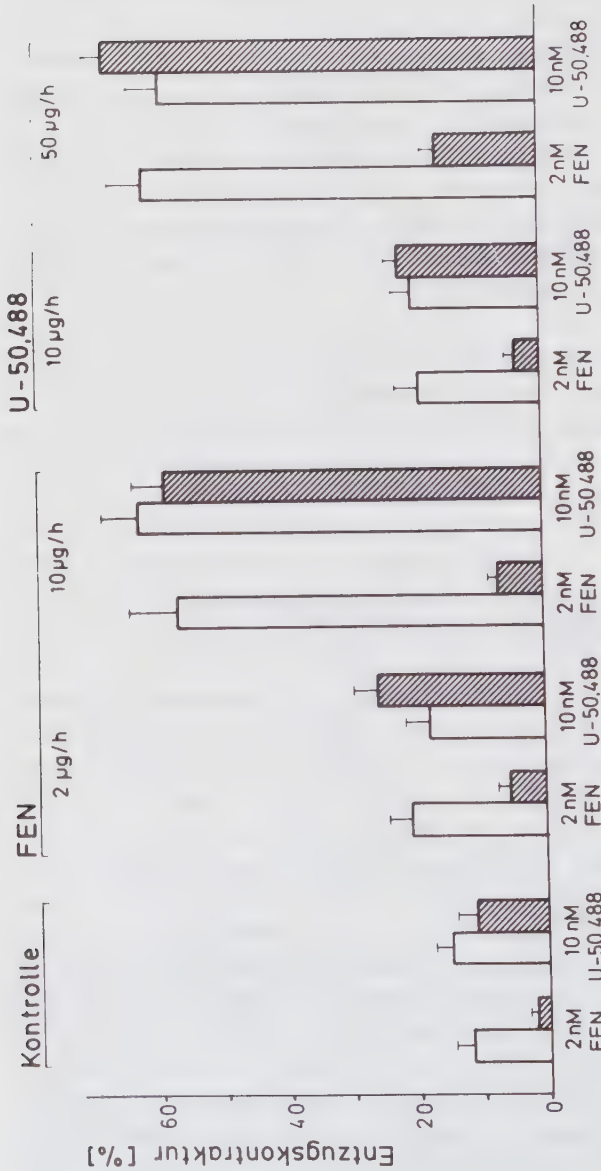


Abb. 23
Entzugskontraktur chronisch opioideponierter GPI-Präparate [Fentanyl (FEN): 2 µg und 10 µg/h; U-50,488: 10 µg/h; Kontrollen: isoton. Natriumchloridlösung] nach Reinkubation mit selektiven Agonisten. Die schraffierten Säulen stellen die mit β-FNA behandelten Präparate, die leeren Säulen Präparate ohne β-FNA-Behandlung dar. Ordinate: Entzugskontraktur (% + S.E.M.); Abszisse: Konzentration der für die Reinkubation verwendeten Agonisten (nM).

ausgelösten Entzugskontrakturen nicht signifikant von denjenigen der Kontrollen, die statt einer Opioidlösung isotonische Natriumchloridlösung erhalten hatten. Selbst bei diesem geringen Abhängigkeitsgrad konnte jedoch keine Tendenz zur selektiven Abhängigkeitsentwicklung an den μ -Rezeptoren festgestellt werden. Die Entzugskontrakturen von Präparaten, die nicht mit β -FNA behandelt worden waren, wiesen nach Reinkubation mit U-50,488 dieselbe Intensität auf wie nach Inkubation mit Fentanyl. Blockade der μ -Rezeptoren durch β -FNA verringerte das Ausmaß der Entzugskontrakturen nach Fentanylinkubation, aber hatte keinen Einfluß auf die Kontrakturen mit U-50,488 inkubierter Präparate. Chronische Infusion von 10 μ g/h Fentanyl hatte einen höheren Abhängigkeitsgrad zur Folge. Die Entzugskontrakturen lagen sowohl nach Fentanyl- als auch nach U-50,488-Inkubation bei etwa 60%. β -FNA-Exposition der Präparate führte wieder zu signifikant reduzierten Kontrakturen nach Fentanylinkubation ($p < 0.001$). Nach chronischer Infusion des selektiven κ -Agonisten U-50,488 reagierten die Längsmuskelpräparate wie nach Fentanylinfusion. Infusion von 50 μ g/h U-50,488 hatte sowohl nach Reinkubation mit μ - als auch mit κ -Agonisten Entzugskontrakturen von etwa 60% zur Folge. Bei der Infusion von 10 μ g/h U-50,488 entwickelte sich - wenn auch zu einem geringeren Grad - ebenfalls Abhängigkeit an den κ - und μ -Rezeptoren. Die Kontrakturen waren nicht signifikant unterschiedlich von denjenigen der Kontrollen. Blockade der μ -Rezeptoren mit β -FNA bewirkte jeweils dramatisch reduzierte Entzugskontrakturen nach Reinkubation mit Fentanyl ($p < 0.001$).

2.1.5. Die Beziehung zwischen Toleranz- und Abhängigkeitsentwicklung

Die auffallende Diskrepanz zwischen Toleranz- und Ab-

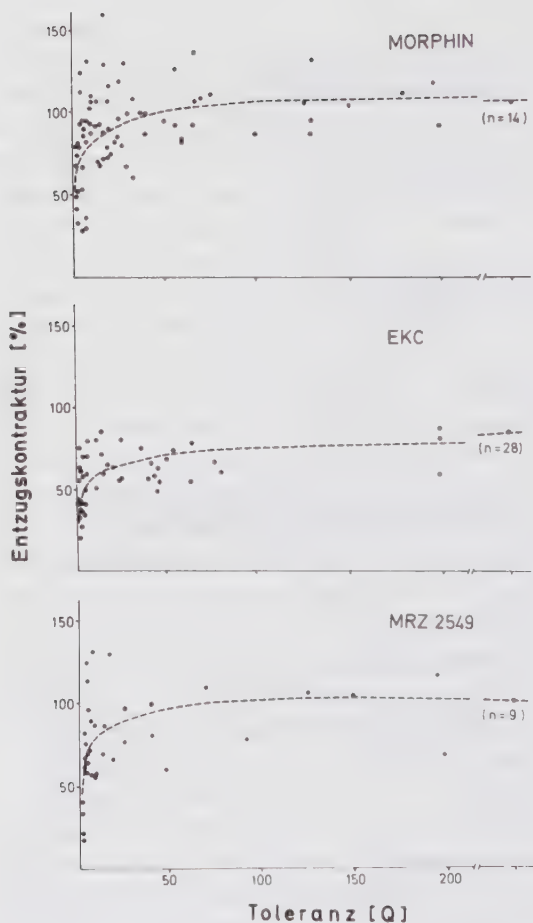


Abb. 24

Korrelation zwischen Abhängigkeits- und Toleranzentwicklung im Plexus myentericus nach chronischer Infusion von Morphin, EKC und MRZ 2549. Ordinate: Entzugskontraktur (%); Abszisse: Toleranzgrad. Jeder Punkt stellt die Daten eines einzelnen Präparates dar, an dem sowohl Toleranz als auch Abhängigkeit ermittelt wurden. Die Mittelwerte für Toleranzgrade über 200 wurden aus Einzeldaten (n) berechnet. Die gestrichelte Linie gibt die durch Best-Fit-Computer-Analyse erhaltene Toleranz-Abhängigkeitskurve an.

hängigkeitsentwicklung im Plexus myentericus, die durch die Abhängigkeitsstudien aufgezeigt wurde, gab Anlaß zur eingehenden Untersuchung des Zusammenhangs zwischen beiden Phänomenen. Durch chronische Verabreichung unterschiedlich hoher Opioidkonzentrationen wurden Darmpräparate mit mehr oder weniger ausgeprägtem Toleranz- bzw. Abhängigkeitsgrad geschaffen. An einem Präparat erfolgte jeweils nacheinander die Bestimmung des Toleranzgrads und die Präzipitation des Entzugs mit Naloxon. Der Toleranzgrad wurde in Bezug zur Intensität der Entzugskontraktur gesetzt.

In Abb. 24 ist diese Beziehung für Präparate nach chronischer Infusion von Morphin sowie der κ -Agonisten EKC und MRZ 2549 dargestellt. Die Beziehung zwischen Toleranz- und Abhängigkeitsentwicklung zeigt keinen linearen Verlauf; die Intensität der Entzugskontrakturen erreicht bereits bei etwa zehnfacher Toleranz ein Maximum, während sich die Toleranz um mehr als das Hundertfache zu steigern vermag. Die Plateaubildung der Entzugssymptomatik trat bei den mit Morphin bzw. MRZ 2549 infundierten Präparaten bei einer Kontraktionshöhe von etwa 100% ein. Die maximalen Entzugskontrakturen mit EKC infundierter Präparate fielen dagegen geringer aus; sie lagen bei etwa 70%, was seine Ursache in der unterschiedlichen Kinetik von EKC haben mag. Die Plateaubildung der Entzugskontrakturen ist nicht Ausdruck einer erschöpften Kontraktionskraft des Muskels, denn zusätzliche elektrische Stimulation oder Zusatz von Serotonin (100 nM) am Höhepunkt der Kontraktur rufen zusätzliche Muskelkontraktionen hervor. Beide Stimulatoren wirken auf den Plexus myentericus über eine Freisetzung von ACh (Adam- Vizi und Vizi, 1978; Paton, 1955; Schaumann, 1957).

Das Ergebnis dieser Untersuchung weist auf einen dissoziierenden Verlauf von Toleranz- und Abhängigkeitsentwicklung hin, der in Übereinstimmung mit den Befunden

der Abhängigkeitsstudien ist.

2.2. Bindungseigenschaften von Opioidrezeptoren im Rattenhirn nach chronischer Morphinexposition

2.2.1. Vorbemerkungen

Wie die Untersuchungen am Längsmuskelpräparat des Meerschweinchenileums ergaben, wird die Opioidabhängigkeit im Plexus myentericus nicht allein durch chronisch aktivierte Rezeptoren kontrolliert; trotz selektiver chronischer Aktivierung einer einzigen Rezeptorpopulation werden grundsätzlich alle Opioidrezeptortypen in die Abhängigkeitsentwicklung miteinbezogen. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, daß sich die Opioidtoleranz im Plexus myentericus selektiv am chronisch aktivierten Rezeptortyp entwickelt (Schulz et al., 1981 b,c; Wüster et al., 1981 a,b). Diese Dissoziation von Toleranz- und Abhängigkeitsentwicklung läßt vermuten, daß beiden Phänomenen unterschiedliche Mechanismen zugrundeliegen. Als Erklärung von Toleranzentwicklung ohne gleichzeitige Entstehung von Abhängigkeit kämen - aufgrund chronischer Aktivierung der Opioidrezeptoren erfolgte - Veränderungen der Bindungseigenschaften (Rezeptorkapazität, -affinität) in Frage (siehe 1.2.2., 1.3).

Tatsächlich wurde gezeigt, daß die chronische Blockade von Opioidrezeptoren durch Opioidantagonisten zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Opioiden (Bardo et al., 1983; Schulz et al., 1979; Tang und Collins, 1978; Tempel et al., 1982; Zukin et al., 1982) sowie zu einer Vermehrung ("up-regulation") von Opioidrezeptorbindungsstellen führt (Bardo et al., 1983; Tempel et al., 1984). Über Auswirkungen chronischer Aktivierung der Opioidrezeptoren durch Agonisten gibt es dagegen wider-

sprüchliche Aussagen. Von einigen Autoren wurden nach chronischer Opioidexposition Veränderungen der Bindungskapazität (meist eine Reduktion) beschrieben (Chang et al., 1982; Davis et al., 1979; Dewey und Chau-Pham, 1976). Die Mehrzahl der Untersuchungen erbrachte allerdings beim Vergleich der Bindungseigenschaften von Ratten- und Mäusehirnen (Bläsig et al., 1979; Dum et al., 1979; Höllt et al., 1975; Klee und Streaty, 1974; Perry et al., 1982; Rubini et al., 1982) bzw. von GPI-Präparaten (Cox und Padhya, 1977) aus toleranten und unbehandelten Tieren keine signifikanten Unterschiede.

Die voneinander abweichenden Ergebnisse der Literatur könnten nicht zuletzt auf die jeweiligen Versuchsbedingungen zurückzuführen sein. Werden beispielsweise nicht-selektive Opioidliganden wie Etorphin, Naloxon oder Naltrexon zur Untersuchung chronisch mit dem μ -Agonisten Morphin infundierten Nervengewebes verwendet (Bläsig et al., 1979; Cox und Padhya, 1977; Höllt et al., 1975; Perry et al., 1982), ist es durchaus denkbar, daß spezifische Veränderungen der μ -Rezeptorpopulation nicht aufgezeigt werden. Andererseits stellten Autoren, die am chronisch infundierten Rattenhirn Veränderungen der Bindungskapazität beobachteten, signifikante Unterschiede zwischen Hirnen aus entzogenen und nicht entzogenen Tieren fest (Davis et al., 1979; Dewey und Chau-Pham, 1976). Dies könnte bedeuten, daß Veränderungen der Bindungseigenschaften nur im nicht entzogenen Zustand der Rezeptoren, d.h. in Anwesenheit des chronisch verabreichten Opioids, demonstrierbar sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen chronischer Morphinexposition auf die Bindungseigenschaften der Morphinrezeptoren im homogenisierten Rattenhirn untersucht. Die experimentellen Bedingungen waren dahin ausgerichtet, den Entzug der chronisch aktivierten Opioidrezeptoren während des Experiments zu

verhindern. Das Rattenhirn stellt im Vergleich zum Längsmuskelpräparat des Meerschweinchenileums ein für Bindungsstudien geeigneteres Untersuchungsmaterial dar; gegenüber dem Muskelgewebe des Ileums ist das Rattenhirn weitaus einfacher zu homogenisieren und liefert somit besser reproduzierbare Resultate. Es erschien aus diesem Grunde angebracht, zunächst im Rattenhirn nach Hinweisen auf eine durch chronische Aktivierung von Opioidrezeptoren erfolgte Änderung der Bindungseigenschaften zu suchen.

Die chronische Morphininfusion erfolgte mittels subkutan implantierter Pellets. Die Ratten erhielten 13 Pellets (à 75 mg Morphinbase) in 10 Tagen. Die Hirne wurden nach der Entnahme in einer morphinhaltigen Lösung suspendiert und während der gesamten Versuchsdauer in Anwesenheit von Morphin (2 nM) gehalten. Als radioaktiv markierter, selektiver μ -Ligand fand ^3H -Dihydromorphin (DHM) Verwendung.

Mit Hilfe der Methode nach Scatchard (1949) wurden Rezeptoraffinität und -kapazität chronisch morphinexponierter und unbehandelter Rattenhirne miteinander verglichen. Das Scatchard-Diagramm ermöglicht die Darstellung und Interpretation der Bindungsdaten eines Liganden an seinem Rezeptor. Bei bekannter Konzentration des spezifisch gebundenen (B) und des freien Anteils (F) des radioaktiven Liganden im Zustand des Gleichgewichts kann sowohl die maximale Bindungskapazität (B_{max}) als auch die Dissoziationskonstante (K_d) ermittelt werden. Der Quotient B/F wird auf der Ordinate gegen den spezifisch gebundenen Liganden (B) auf der Abszisse aufgetragen. Ist die Affinität des Liganden zu allen Bindungsstellen gleich, stellt das Scatchard-Diagramm eine Gerade dar, die durch folgende Gleichung festgelegt ist:

$$B/F = \frac{B_{\max} - B}{K_d}$$

B = gebundener Anteil der
 F = freier Anteil des Liganden
 $B_{\max}$ = maximale Bindungskapazität
 K_d = Dissoziationskonstante des
 Liganden-Rezeptor-Komplexes

(Bennett, 1978)

Aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse ergibt sich die maximale Bindungskapazität $B_{\max}$, während der Schnittpunkt mit der Ordinate (B/F) zur Berechnung der Dissoziationskonstante herangezogen wird. Die Dissoziationskonstante verhält sich umgekehrt proportional zur Bindungsaffinität des Liganden. Eine Veränderung der Affinität bei gleichbleibender $B_{\max}$ drückt sich in einer Verschiebung des Schnittpunktes der Geraden mit der Ordinate aus. Die Gerade flacht entweder ab (d.h. die Affinität verringert sich) oder sie wird steiler (d.h. die Affinität erhöht sich). Im allgemeinen bewirkt der Zusatz eines kompetitiv wirkenden Liganden eine Reduktion der Affinität; die Gerade flacht bei unveränderter $B_{\max}$ ab. Verändert sich - bei gleichbleibender Affinität - die Rezeptorkapazität, so kommt es zu einer Parallelverschiebung der Geraden nach links (d.h. die Kapazität verkleinert sich) oder nach rechts (d.h. die Kapazität wird größer).

Grundsätzlich war zu erwarten, daß sich die zusätzliche Inkubation mit einer definierten Morphinkonzentration negativ auf die Affinität des Radioliganden ^3H -Dihydromorphin auswirken würde, d.h. in Anwesenheit von Morphin würde die Gerade abflachen. Ein unterschiedlich ausgeprägtes Abflachen der Geraden bei toleranten und unbehandelten Hirnen könnte jedoch als Hinweis auf Affinitätsveränderungen infolge chronischer Morphinexposition gelten. Bei unveränderter Bindungskapazität sollte $B_{\max}$ bei toleranten und unbehandelten Hirnpräparaten identisch sein. Eine Verschiebung von $B_{\max}$ wäre Ausdruck einer infolge chronischer Morphinexposition

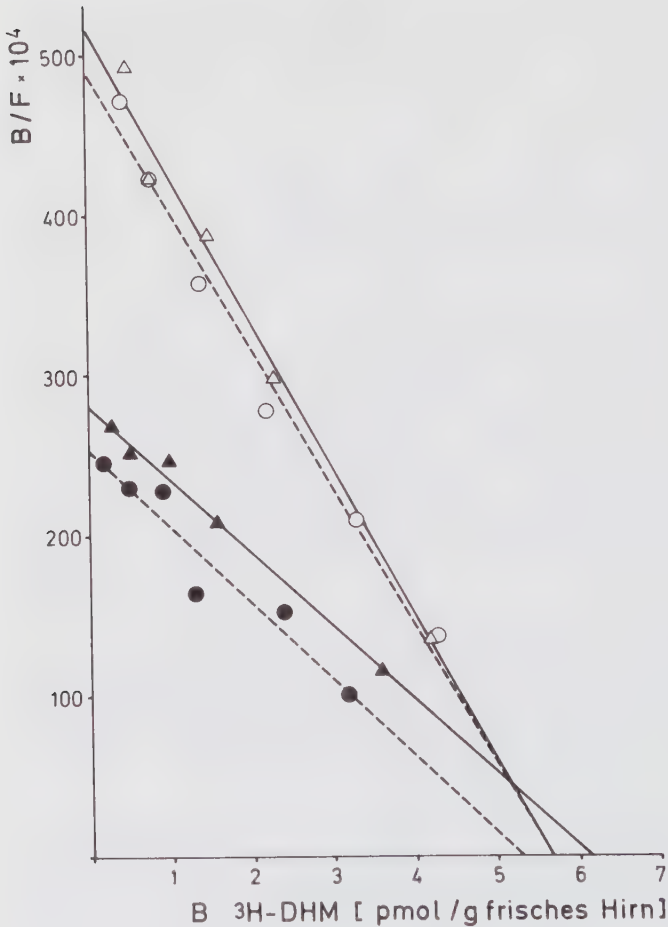


Abb. 25

Scatchard Plot-Analyse der Bindungsdaten von Rattenhirnhomogenaten nach chronischer Infusion von Morphin im entzogenen Zustand (Δ) bzw. in Gegenwart von 2 nM Morphin ($\blacktriangle$) - Vergleich mit den Bindungsdaten unbehandelter Kontrollen ($\circ$ / $\bullet$). Ordinate: B/F (gebundener Anteil von ^3H -Dihydromorphin (DHM) / freier Anteil von ^3H -DHM) $\times 10^4$; Abszisse: (gebundener Anteil von ^3H -DHM) (pmol/g frisches Hirn). Die Punkte stellen die Mittelwerte aus mindestens 4 unabhängigen Versuchen dar.

veränderten maximalen Anzahl von Bindungsstellen.

2.2.2. Ergebnis

In Abb. 25 sind die Scatchard-Diagramme morphintoleranter und unbehandelter Rattenhirne dargestellt. Der Verlauf der Geraden wurde mit Hilfe der linearen Regression der Mittelwerte bestimmt. Ohne zusätzliche Morphininkubation in vitro wurden für unbehandelte und chronisch morphinexponierte Hirne identische Scatchard-Diagramme ermittelt. Wie aus der Tabelle 3 ersichtlich ist, konnten weder hinsichtlich der maximalen Bindungskapazität noch im Hinblick auf die Affinität Unterschiede festgestellt werden. Inkubation mit 2 nM Morphin bewirkte bei morphintoleranten und unbehandelten Hirnpräparaten eine Verringerung der Affinität von ^3H -DHM um etwa 50%. Das Scatchard-Diagramm der chronisch morphinexponierten Hirne zeigte gegenüber den unbehandelten Präparaten einen unterschiedlichen Verlauf. Die Ermittlung des signifikanten Unterschieds zwischen den einzelnen Punkten der beiden Geraden offenbarte jedoch nur eine signifikante Abweichung in einem einzigen Punkt ($p < 0.02$). Die Berechnung der Dissoziationskonstante ergab für beide Gruppen nahezu identische Werte; der Unterschied zwischen toleranten und naiven Hirnpräparaten hinsichtlich der maximalen Bindungskapazität (siehe Tabelle) erwies sich als nicht signifikant ($p > 0.05$).

Die Analyse nach Scatchard vermochte keinen konkreten Hinweis auf veränderte Bindungseigenschaften von Opioidrezeptoren des Rattenhirns infolge chronischer Aktivierung durch einen Agonisten zu erbringen. Keinesfalls lieferte sie einen Anhaltspunkt für eine Reduktion der Opioidrezeptorbindungsstellen, wie sie etwa von Collier als potentieller Mechanismus der Toleranzentstehung po-

stuliert wurde (siehe 1.2.2.1.). In Anbetracht der negativen Befunde am Rattenhirn wurde eine entsprechende Untersuchung am Plexus myentericus des Meerschweinchenileums nicht durchgeführt.

Tabelle 3

Mit Hilfe der Analyse nach Scatchard graphisch ermittelten Dissoziationskonstante ($K_d \pm \text{S.E.M.}$) und maximale Bindungskapazität ($B_{\text{max}} \pm \text{S.E.M.}$) von ^3H -Dihydromorphin bei naiven und morphintoleranten Rattenhirnen in An- und Abwesenheit von 2 nM Morphin

	n	$K_d \times 10^{-9} \text{M}$	B_{max} (pmol/g Hirn)
naiv	8	1.3 ± 0.11	5.8 ± 0.38
tolerant/ entzogen	7	1.2 ± 0.18	5.9 ± 0.4
naiv/ 2 nM Morphin	4	2.2 ± 0.13	5.4 ± 0.22
tolerant/ 2 nM Morphin	4	2.3 ± 0.42	6.3 ± 0.4

3. Diskussion

Die "selektive Toleranz" beschreibt das Phänomen der Koexistenz normal empfindlicher und hochtoleranter Opioidrezeptoren, wie sie in isolierten Organen (Längsmuskelpräparat des Meerschweinchenileums, Samenleiter der Maus) nach chronischer Aktivierung einer spezifischen Opioidrezeptorpopulation demonstriert wurde (Schulz et al., 1980 a,b; 1981 b,c; Wüster et al., 1981 a,b). Dieser Befund warf die Frage auf, ob sich auch Opioidabhängigkeit nur jenen Rezeptoren zuordnen läßt, die chronisch aktiviert und somit tolerant wurden. Eine derartige Vorstellung würde Theorien genügen, die für Opioidtoleranz und -abhängigkeit einen gemeinsamen Mechanismus ("unitary mechanism") postulieren. Entwickeln sich Abhängigkeit und Toleranz über identische Mechanismen, dann müßte die "selektive Toleranz" mit "selektiver Abhängigkeit" dieser Rezeptoren verknüpft sein.

Dieses Konzept des "unitary mechanism", das die Grundlage einer Reihe von Theorien zur Erklärung der Phänomene Toleranz und Abhängigkeit bildet, ist bisher nicht durch alle experimentellen Untersuchungen bestätigt worden (siehe 1.3). Es gibt vielmehr Hinweise auf die Möglichkeit einer Dissoziation zwischen Toleranz und Abhängigkeit. Dies ist durch einen beiden Phänomenen gemeinsamen Mechanismus nicht ausreichend erklärt und läßt eine universelle Gültigkeit des "unitary mechanism"-Konzeptes fraglich erscheinen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Problematik der Dissoziation von Toleranz- und Abhängigkeitsentwicklung am Plexus myentericus des Meerschweinchenileums behandelt. Anhand dieses Präparates, das infolge chronischer Opioidexposition sowohl Toleranz als auch Abhängigkeit entwickelt (Schulz und Herz, 1976 a), wurde untersucht, ob sich die Abhängigkeit analog zur

Toleranz selektiv allein an jener Rezeptorpopulation entwickelt, die chronisch aktiviert wurde.

Die hier dargestellten Untersuchungen zeigen, daß "selektive Toleranz" nicht mit "selektiver Abhängigkeit" einhergeht. Dies bedeutet, daß im Plexus myentericus des Meerschweinchens zwar normal empfindliche (naive) und hochtolerante Opioidrezeptoren koexistieren können, daß aber Opioidabhängigkeit sowohl von chronisch aktivierten als auch von naiven Rezeptoren kontrolliert wird. So präzipitierte Naloxon an isolierten Ileumpräparaten, deren μ -Rezeptoren chronisch aktiviert wurden, auch über eine Interaktion mit nicht chronisch aktivierten κ -Rezeptoren eine Entzugskontraktur. Dies gilt umgekehrt für Präparate mit selektiv toleranten κ -Rezeptoren. Diese "Kreuzabhängigkeit" der nicht chronisch aktivierten Rezeptorpopulation zeigte sich bereits bei einem sehr niedrigen Abhängigkeitsgrad; durch die Infusionsdosis des chronisch verabreichten Opioids wurde lediglich die Intensität des Entzugssymptoms beeinflusst.

Grundsätzlich könnten mangelnde Rezeptorselektivität des Agonisten oder zu hohe Infusionsmengen eine "Kreuzabhängigkeit" bedingen. Daß diese Kriterien bei den hier dargestellten Versuchen nicht relevant waren, läßt sich daran ermesen, daß selbst bei einem - infolge gering dosierter Infusion hochselektiver Opiode wie U-50,488 (κ -Agonist) und Fentanyl (μ -Agonist) - minimalen Abhängigkeitsgrad nicht nur Abhängigkeit an der jeweils chronisch aktivierten, sondern auch "Kreuzabhängigkeit" an der naiven Rezeptorpopulation demonstriert wurde. Die radioimmunologische Bestimmung der Serumkonzentration des chronisch verabfolgten Fentanyls ergab selbst bei der hohen Infusionsdosis von 10 μ g/h Fentanyl einen Wert, der sich im ED₅₀-Bereich von Fentanyl

am elektrisch stimulierten Längsmuskelpräparat befindet. Da das lipophile Fentanyl durch eine hohe Plasmaproteinbindung gekennzeichnet ist (Höllt und Teschemacher, 1975) und aufgrund seines hohen Verteilungskoeffizienten (Wüster, 1978) eine Anreicherung in Lipidmembranen und Fettgewebe erfolgt (Hess et al., 1971), dürfte die Fentanylkonzentration am Wirkort (Plexus myentericus) nur einen Teil der Serumkonzentration betragen. Somit ist mit großer Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, daß das chronisch infundierte Fentanyl selektiv mit den μ -Rezeptoren des Plexus myentericus interagiert. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß Schulz et al. (1981 b,c) und Wüster et al. (1981 a,b) im Vergleich zur vorliegenden Arbeit durchwegs sehr hohe Opioidkonzentrationen infundierten und dennoch eine selektive Toleranzentwicklung beobachteten.

Ebenso könnte die Verwendung zu hoher Opioidkonzentrationen bei der in-vitro-Inkubation des isolierten Organs zu keiner selektiven Interaktion mit den Opioidrezeptoren führen. In diesem Fall würde eine durch Naloxon präzipitierte Entzugskontraktur zu der irrtümlichen Schlußfolgerung verleiten, daß sich "Kreuzabhängigkeit" entwickelt hat. Um derartigen Mechanismen vorzubeugen, wurden die μ -Rezeptoren durch den alkylierenden Opioidantagonisten β -Funaltrexamin (β -FNA) ausgeschaltet; nach irreversibler Blockade der μ -Rezeptoren können Entzugssymptome nur über κ -Rezeptoren bedingt sein. Die Entzugskontrakturen von Präparaten mit blockierten μ -Rezeptoren waren gegenüber Präparaten mit intakten μ -Rezeptoren grundsätzlich drastisch reduziert - unabhängig davon, ob es sich um Präparate mit intakten μ - oder κ -Rezeptoren handelte; daraus läßt sich ersehen, daß sowohl in μ - als auch in κ -toleranten Präparaten "abhängige" μ -Rezeptoren existieren.

Trotz irreversibler Blockade der μ -Rezeptoren mit β -FNA zeigten Längsmuskelpräparate nach Reinkubation mit steigenden Fentanylkonzentrationen Entzugskontrakturen, deren Intensität jedoch im Vergleich zu intakten Präparaten selbst bei Inkubation mit hohen Fentanylkonzentrationen signifikant geringer war. Um der Frage nachzugehen, mit welcher Art von Opioidrezeptoren Fentanyl nach Blockade der μ -Rezeptoren interagiert, wurden die Naloxon- K_e -Werte für Fentanyl und den κ -Agonisten EKC an mit β -FNA behandelten Präparaten ermittelt. Die Untersuchungen ergaben, daß Fentanyl in diesen Präparaten mit einem Rezeptortyp interagiert, zu dem Naloxon eine geringere Affinität besitzt als zu den von prototypischen κ -Agonisten wie EKC und U-50,488 besetzten κ -Rezeptoren. Möglicherweise handelt es sich dabei um einen Subtyp der κ -Rezeptorpopulation. Bei der Bestimmung des pA_2 -Werts von Morphin gegen Naloxon im GPI nach Blockade der μ -Rezeptoren durch β -FNA fanden Ward et al. (1982 a) eine große Ähnlichkeit mit dem pA_2 -Wert des κ -Agonisten EKC; die Autoren zogen daraus die Schlußfolgerung, daß Morphin nach Ausschaltung der μ -Rezeptoren mit κ -Rezeptoren interagiert.

Der Versuch, den Abhängigkeitsgrad von Präparaten mit blockierten κ -Rezeptoren mit Hilfe von β -Chlornaltrexamin (β -CNA) analog dem für β -FNA entwickelten Schema zu untersuchen, wurde von einem technischen Problem behindert: das zum Schutz der μ -Rezeptoren in hoher Konzentration eingesetzte lipophile Fentanyl ließ sich nicht innerhalb eines akzeptablen Zeitraums auswaschen. Es ist davon auszugehen, daß sich nach einer mindestens 60-minütigen Waschprozedur nur mehr geringe Mengen Fentanyl im Gewebe befinden; dennoch ermöglichte selbst die Anwesenheit solch geringer Fentanylkonzentrationen in Präparaten mit irreversibel blockierten, chronisch aktivierten κ -Rezeptoren durch Naloxon präzipitierte Entzugskontrakturen. Dies deutet darauf hin, daß auch

die μ -Rezeptorpopulation in die durch chronische Aktivierung der κ -Rezeptoren bedingte Abhängigkeitsentwicklung einbezogen wurde.

Der Erwähnung bedürfen die Entzugskontrakturen der Kontrollpräparate, die aus mit isotonischer Natriumchloridlösung infundierten Tieren stammen. Die Kontrollen reagierten nach Inkubation mit Fentanyl sowie mit U-50,488 auf Naloxon, wobei β -FNA-Behandlung die Kontraktur nach Fentanylinkubation reduzierte. Dieses Phänomen mag auf einer raschen Anpassung des durch die Opioidwirkung betroffenen Systems an das in vitro zugeführte Opioid beruhen (Tachyphylaxie). Andererseits könnte es durch eine Aktivierung der Opioidrezeptoren durch endogene Opioidpeptide, wie beispielsweise Dynorphin A oder die Enkephaline, bedingt sein, die im myenterischen Plexus nachgewiesen wurden (Kromer et al., 1978; Linnoila et al., 1978); die Adaption des Opioid-effektorsystems könnte demnach nicht nur bei chronischer Infusion exogener Opioide, sondern auch als Reaktion auf eine - möglicherweise in Streßsituationen - vermehrte Freisetzung endogener Opioide erfolgen (Christie und Chesher, 1982; Eisenberg, 1982 a,b). Allerdings werden derartige Entzugsreaktionen nicht chronisch aktivierter Präparate nur vereinzelt beobachtet; darüberhinaus ist ihre Intensität im Vergleich zu chronisch aktivierten Präparaten unerheblich. Eine signifikante Beeinflussung der Abhängigkeitsstudien durch "endogene Abhängigkeit" ist daher nicht anzunehmen.

Die "Kreuzabhängigkeit" zwischen den μ - und κ -Rezeptoren des Plexus myentericus ließe sich dadurch erklären, daß myenterische μ - und κ -Opioidrezeptoren jeweils gemeinsam an einer identischen Nervenzelle lokalisiert sind und ein gemeinsames Effektorsystem kontrollieren. Auf diese Weise wären sowohl chronisch aktivierte als auch "naive" Opioidrezeptoren von der Abhängigkeitsent-

wicklung betroffen. Die Ergebnisse anderer Autoren scheinen diese Schlußfolgerung zu bestätigen. Wird das Meerschweinchenileum nämlich über einen längeren Zeitraum gegenüber nichtopioiden, aber ebenfalls inhibitorisch wirksamen Substanzen exponiert - wie etwa Clonidin, einem α_2 -Adrenozeptoragonisten, und dem mit A_1 -Purinozeptoren interagierenden Adenosin - so entwickelt sich wie bei chronischer Opioidexposition Abhängigkeit (Collier et al., 1981; Collier und Tucker, 1983). Die mit Hilfe spezifischer Antagonisten präzipitierten Entzugskontrakturen clonidin- bzw. adenosinabhängiger GPI-Präparate werden durch Opiode blockiert; umgekehrt ist es möglich, die durch Naloxon verursachten Entzugskontrakturen opioidabhängiger Präparate durch Clonidin bzw. Adenosin zu unterdrücken (Collier et al., 1981; Collier und Tucker, 1983). Diese Befunde deuten - ebenso wie die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen - auf die Existenz eines über verschiedene Rezeptoren kontrollierten Effektorsystems hin; aufgrund chronischer Beeinflussung durch einen Agonisten erfolgte adaptive Veränderungen beziehen dann auch die nicht chronisch aktivierten, jedoch an dasselbe Effektorsystem gekoppelten Rezeptoren mit ein ("convergent dependences"; Collier, 1984; Collier und Tucker, 1983).

Als wesentlicher Bestandteil eines gemeinsamen Effektorsystems inhibitorisch wirksamer Substanzen im Plexus myentericus wird der "second messenger" cAMP diskutiert (Collier, 1984). Ein Zusammenhang zwischen der Opioidwirkung und cAMP wurde tatsächlich sowohl im Zentralnervensystem als auch in Neuroblastomazellen aufgezeigt (Collier, 1980; Collier und Francis, 1975; Collier et al., 1974, 1975; Collier und Roy, 1974; Francis et al., 1975; Mehta und Johnson, 1974; Sharma et al., 1975 a, b). Man nimmt an, daß die Produktion von cAMP, dem eine Beteiligung an zahlreichen Hormon- und Transmitterwirkungen zugeschrieben wird, der Kontrolle durch zwei

regulatorische Einheiten (N) unterliegt: einer die cAMP-Produktion stimulierenden Einheit N_s und einer die Adenylatcyclaseaktivität hemmenden Einheit N_i (Rodbell, 1980). Die Opiode werden - wie auch Clonidin und Adenosin - jenen Substanzen zugeordnet, die N_i stimulieren, d.h. einen hemmenden Einfluß auf die cAMP-Produktion ausüben (Rodbell, 1980). Der experimentelle Nachweis einer Beteiligung von cAMP an der Opioidwirkung im Plexus myentericus konnte bisher jedoch nicht erbracht werden.

Grundsätzlich wäre gemäß dem "unitary mechanism"-Konzept zu erwarten, daß die für die Abhängigkeitsentwicklung verantwortliche kompensatorische Hypertrophie eines durch beide myenterische Opioidrezeptorpopulationen gemeinsam kontrollierten Effektorsystems auch in Bezug auf die Toleranzentwicklung sowohl den chronisch aktivierten als auch den "naiven" Rezeptortyp betrifft. In Anbetracht der Befunde von Schulz et al. (1981 b,c) und Wüster et al. (1981 a,b), die im Plexus myentericus des Meerschweinchens nach chronischer Aktivierung einer Rezeptorpopulation die Entwicklung selektiver, hoher Toleranz feststellten, muß aber davon ausgegangen werden, daß das "unitary mechanism"-Konzept zur Erklärung der Toleranzentstehung im GPI nicht ausreicht.

Die mit dem Zusammenhang zwischen Toleranz- und Abhängigkeitsentwicklung im Plexus myentericus befaßten Untersuchungen der vorliegenden Arbeit brachten deutlich die Diskrepanz zwischen Toleranz- und Abhängigkeitsentwicklung im GPI zum Ausdruck. Die Entwicklung der beiden Phänomene verläuft nicht parallel. Die Abhängigkeitsentwicklung ist durch eine bereits bei sehr geringen Toleranzgraden einsetzende Plateaubildung gekennzeichnet; diese beruht nicht auf einer limitierten Kontraktionskraft des Muskels, denn elektrische Stimulation bzw. Serotonin rufen selbst am Höhepunkt der Kon-

traktur noch zusätzliche Muskelkontraktionen hervor. Die Plateaubildung dürfte vielmehr auf eine begrenzte Fähigkeit des adaptierenden Enzymsystems, die inhibitorische Wirkung der Opiode mit einer gesteigerten Aktivität zu kompensieren, zurückzuführen sein. Der begrenzten Kapazität der Abhängigkeitsentwicklung steht eine hohe Steigerungsfähigkeit der Toleranz gegenüber; zusammen mit dem Befund der "selektiven Toleranzentwicklung" ist dies ein weiteres Anzeichen dafür, daß an der Toleranz- bzw. Abhängigkeitsentwicklung im Plexus myentericus des Meerschweinchens unterschiedliche Mechanismen beteiligt sind.

Möglicherweise spielen bei der Toleranzentwicklung im GPI mehrere Mechanismen eine Rolle (Cox, 1978). Anlaß zu dieser Vermutung gaben Untersuchungen am toleranten GPI, die einen zweiphasigen Verlauf beim Abklingen der Toleranz offenbarten: in Anwesenheit des chronisch verabreichten Opioids wurden hohe Toleranzgrade beschrieben, die sich bei Entzug des Opioids drastisch verringern; eine auch nach Entzug des Opioids vorhandene, stabilere Komponente der Toleranz baut sich erst allmählich ab (Goldstein und Schulz, 1973; Hammond et al., 1975; Schulz und Herz, 1976 a). Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, daß die protrahierte Komponente der Toleranz im Plexus myentericus auf einer Verringerung von Reserve-Opioidrezeptoren ("spare receptors") der chronisch aktivierten Population beruhen könnte (Chavkin und Goldstein, 1982; 1984).

Die beobachtete hohe, an die Anwesenheit des chronisch verabreichten Opioids gebundene Toleranz ähnelt einer durch chronische Aktivierung bedingten Rezeptordesensibilisierung, die im Entzug rasch reversibel ist (Chavkin und Goldstein, 1984). Diese Komponente der Toleranz ist möglicherweise Ausdruck veränderter Bindungseigenschaften der Opioidrezeptoren. So könnte sich die chro-

nische Aktivierung der Rezeptoren sowohl auf die Anzahl der Bindungsstellen als auch auf die Rezeptoraffinität negativ auswirken. Eine Rezeptorreduktion ("down regulation") wurde bei Hormon- und Neurotransmitterrezeptoren beobachtet, die infolge chronischer Aktivierung an der Membranoberfläche Aggregate ("Cluster") bilden und als Cluster ins Zellinnere aufgenommen werden (Internalisierung) (Catt et al., 1979). Eine verminderte Rezeptoraffinität durch "negative Kooperativität" konnte bei Insulinrezeptoren festgestellt werden (De Meyts et al., 1973). In der Tat wurde nach chronischer Blockade von Opioidrezeptoren mit Opioidantagonisten von einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Opioidagonisten ("supersensitivity") sowie von einer Vermehrung von Opioidbindungsstellen ("up-regulation") berichtet (Bardo et al., 1983; Schulz et al., 1979; Tang und Collins, 1978; Tempel et al., 1982; Zukin et al., 1982). Eine Reihe von Autoren, die sich mit der Untersuchung der Bindungseigenschaften von Opioidrezeptoren nach chronischer Aktivierung durch Opioidagonisten befaßten, gelangten dagegen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Während nach kontinuierlicher Enkephalinexposition von Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen eine Clusterbildung der Rezeptoren bzw. eine Reduktion der Enkephalinbindung beschrieben wurde (Chang et al., 1982; Hazum et al., 1980), konnten viele Autoren keine Veränderungen feststellen (Bläsig et al., 1979; Cox und Padhya, 1977; Dum et al., 1979; Höllt et al., 1975; Klee und Streaty, 1974; Perry et al., 1982; Rubini et al., 1982).

Ein Teil der vorliegenden Arbeit bestand aus der Untersuchung von Bindungskapazität bzw. -affinität chronisch aktivierter Opioidrezeptoren in Gewebehomogenat; dabei wurden die Rezeptoren im Gegensatz zu früheren Arbeiten auch in vitro in Anwesenheit des chronisch verabreichten Opioids (Morphin) gehalten, da damit zu rechnen ist, daß während chronischer Morphinexposition entstan-

dene Veränderungen sich im Entzug möglicherweise rasch zurückbilden. Die Studien wurden am Rattenhirn durchgeführt, weil das für Opioidrezeptorbindungsstudien gebräuchliche Rattenhirn im Vergleich zum Längmuskelpreparat des Meerschweinchenileums leichter zu homogenisieren ist und somit besser reproduzierbare Resultate liefert. Die nach der Methode von Scatchard (1949) analysierten Bindungsdaten ergaben jedoch keinen Anhaltspunkt für eine Veränderung der Bindungskapazität bzw. -affinität infolge chronischer Aktivierung der Rezeptoren.

Die Ursache der Rezeptordesensibilisierung ist allem Anschein nach weniger auf der Bindungsebene des Opioidrezeptors, sondern vielmehr in dem der Bindungsstelle nachgeschalteten System zu suchen. Einige Befunde deuten darauf hin, daß chronische Aktivierung von Opioidrezeptoren zu einem "Abkoppeln" der Rezeptoren vom Effektorsystem führt (Law et al., 1982; Wüster et al., 1983), wie es auch für β -Adrenorezeptoren beschrieben wurde (Harden et al., 1979; Strulovici et al., 1984).

Es dürfte jedoch auszuschließen sein, daß diejenigen Opioidrezeptoren des Plexus myentericus, die durch eine selektive, hohe Toleranzentwicklung gekennzeichnet sind (Schulz et al., 1981 b,c; Wüster et al., 1981 a,b), mit jenen Opioidrezeptoren identisch sind, an denen trotz selektiver chronischer Aktivierung jeweils die Entwicklung von "Kreuzabhängigkeit" beobachtet wurde. Es ist denkbar, daß mehrere Effektorsysteme bzw. Adaptationsmechanismen myenterischer Opioidrezeptoren existieren, die möglicherweise mit verschiedenen physiologischen Funktionen endogener Opioide im Plexus myentericus zusammenhängen.

Der Befund der "Kreuzabhängigkeit" zwischen μ - und κ -Opioidrezeptoren im Plexus myentericus des Meer-

schweinchenileums steht im Gegensatz zu Ergebnissen von Studien am spinalisierten Hund: die chronische Verabfolgung des μ -Agonisten Morphin bewirkt hier eine "selektive" Abhängigkeitsentwicklung, die dadurch gekennzeichnet ist, daß der κ -Agonist Ketocyclazocin die Entzugssymptome morphinabhängiger Hunde nicht zu unterdrücken vermag (Martin et al., 1976). Tulunay et al. (1981) berichteten dagegen von einer Unterdrückung des Entzugssymptoms "Jumping" bei morphinabhängigen Mäusen durch den κ -Agonisten Dynorphin; bei heroinabhängigen Menschen wurde eine signifikante Abschwächung von Entzugerscheinungen durch den δ -Agonisten DADL sowie den κ -Agonisten Dynorphin beschrieben (Wen et al., 1984). Grundsätzlich sind bei der Beurteilung von Befunden am Gesamtorganismus sowohl die komplexeren Zusammenhänge als auch die jeweiligen experimentellen Bedingungen zu berücksichtigen, wie etwa die Auswahl der Kriterien, die aus der Vielfalt der Opioidwirkungen bzw. der Entzugssymptome zur Auswertung herangezogen wurden und durch welche die Aussage wesentlich beeinflusst werden kann. Somit ist es nicht verwunderlich, wenn Untersuchungen chronischer Opioidwirkungen an Lebewesen nicht immer zu übereinstimmenden Ergebnissen führen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß - wie im Plexus myentericus des Meerschweinchens - auch in einigen Bereichen des Zentralnervensystems unterschiedliche Opioidrezeptortypen mit demselben Effektorsystem verknüpft sind, so daß nach chronischer Aktivierung einer Rezeptorpopulation die Abhängigkeit auch von der nicht chronisch aktivierten Rezeptorpopulation kontrolliert wird.

Zusammenfassung: Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dokumentieren, daß selektive chronische Aktivierung spezifischer Opioidrezeptorpopulationen des Plexus myentericus des Meerschweinchenileums zu "Kreuzabhängigkeit" zwischen μ - und κ -Rezeptoren führt. Die "selektive

Toleranzentwicklung" myenterischer Opioidrezeptoren (Schulz et al., 1981 b,c; Wüster et al., 1981 a,b) geht demnach nicht mit "selektiver Abhängigkeit" einher. Toleranz- und Abhängigkeitsentwicklung zeigen keinen parallelen Verlauf; während hohe Toleranzgrade erreicht werden, ist die Abhängigkeit nur begrenzt steigerungsfähig. Es ist anzunehmen, daß diejenigen Opioidrezeptoren, die infolge chronischer Aktivierung Abhängigkeit entwickeln, ein gemeinsames Effektorsystem kontrollieren, dessen adaptive Veränderungen auch die jeweils nicht chronisch aktivierten Rezeptoren betreffen. Dieses Phänomen, als "convergent dependences" bezeichnet (Collier, 1984; Collier und Tucker, 1983), würde den vorliegenden Befund der "Kreuzabhängigkeit" erklären. Die Entwicklung der selektiven hohen Toleranz dürfte dagegen auf einen anderen Mechanismus zurückzuführen sein. Die durch die hier dargestellten Untersuchungen dokumentierte Dissoziation von Toleranz- und Abhängigkeitsentwicklung stellt nicht nur die Gültigkeit des "unitary mechanism"-Konzeptes in Frage; sie deutet darüberhinaus auch auf die Existenz unterschiedlicher Wirkungs- bzw. Adaptionsmechanismen myenterischer Opioidrezeptoren hin.

4. Experimenteller Teil

4.1 Materialien und Substanzen

Exogene Opiode:

Morphinhydrochlorid von Merck, Darmstadt

Normorphinhydrochlorid von Bios Products, Brüssel, Belgien

Fentanyl Dihydrogencitrat von Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgien

Ethylketocyclazocinmethansulfonat von Sterling-Winthrop, Rensselaer, USA

MRZ 2549 (= (-)-(1R,5R,9R,2`-S)-5,9-Dimethyl-2`-hydroxy-2-(2-methoxypropyl)-6,7-benzomorphanhydrochlorid)

von Dr. H. Merz, Boehringer Mannheim

U-50,488 (= trans-3,4-Dichloro-N-methyl-N-[2-(1-pyrrolidinyl)cyclohexyl]-phenylacetamid) von Upjohn, Kalamazoo,

USA

Naloxonhydrochlorid von Endo Laboratories, New York, USA

β -Funaltrexaminhydrochlorid und β -Chlornaltrexaminhydrochlorid von Dr. A.E. Takemori und Dr. P.S. Portogheese, University of Minnesota, Minneapolis, USA

Opioidpeptide:

α -Neo-Endorphin(1-8) von Peninsula Laboratories, Palo Alto, USA

Dynorphin A und Dynorphin A(1-13) von Bachem, Bubendorf, Schweiz

radioaktiv markierte Opiode:

³H-Dihydromorphin (80 Ci/mmol) von Amersham, England

³H-Fentanyl (10 Ci/mmol) von Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgien

Antifentanylantiserum von Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgien

Die verwendeten radioaktiven Opiode wurden frisch bezogen; ihre radiochemische Reinheit lag laut Firmenauskunft zwischen 91 und 95% (dünn-schichtchromatographische Analyse auf Silicagel bzw. Cellulose). Die nicht aufgeführten Chemikalien kamen von der Firma Merck, Darmstadt.

Zubereitung der Lösungen:

Für die Verwendung zur chronischen Infusion wurden die Opiode in isotonischer Natriumchloridlösung oder in doppelt destilliertem Wasser gelöst. Die Konzentrationsangaben der Lösungen von Opioidsalzen beziehen sich auf die freien Basen.

Die in vitro verwendeten Stammlösungen der Opiode wurden mit doppelt destilliertem Wasser hergestellt. Die Konzentrationen für das Organbad wurden so gewählt, daß die Zugabe von 0.5 bis 10 μ l der Lösung die gewünschte Endkonzentration im Bad ergab. Die hochreaktiven und in wäßriger Lösung instabilen Substanzen β -FNA und β -CNA wurden in wasserfreiem Methanol (β -FNA) bzw. Äthanol (β -CNA) gelöst, in Eppendorfgeläße (1.5 ml) portioniert und unter Vakuum (Speed Vac Concentrator) vom Lösungsmittel befreit. Für die einzelnen Versuche wurden kleine Anteile in doppelt destilliertem Wasser gelöst und sofort verbraucht. Die Lagerung der Opioidlösungen erfolgte bei -20°C . Während der Versuche wurden sie in Eis aufbewahrt.

4.2. Geräte und Hilfsmittel

4.2.1. Längsmuskelpräparat

Stimulator: Physiologischer Stimulator (Frequenz 0.1 Hz, Reizbreite 0.5 msec, 60 V) von Dressler Elektronik
Kraftaufnehmer HBM Q 11, 10 p, von Hottinger und Baldwin

Meßtechnik

Vorverstärker HBM KWS 3072 von Hottinger und Baldwin
Meßtechnik

Zweikanalschreiber: Rikadenki Mark II von Baldwin Meß-
technik und Kipp & Zonen BD 41 von Kipp und Zonen

Thermostat: Ultra-Thermostat K 5 von Colora Meßtechnik
GmbH

Gas: Linde-Carbogen (CO_2 5 V/V%, O_2 95 V/V%) von Linde
AG

Wasserstrahlpumpe

4.2.2. Radiorezeptorassay

Homogenisator: IKA-RW 15 von Janke und Kunkel

Vakuumpumpe: Vacuumbrand RD 4 von Brand

Filtergerät: Millipore

Filterscheiben: Glasfaserfilter Whatman GF/B (2.5 cm
Durchmesser)

Schüttelinkubator: Köttermann 3047

Zentrifuge: Sorvall RC-58 Refrigerated Superspeed Cen-
trifuge von Du Pont Instruments

Flüssigkeitsszintillationsspektrometer: Beckman LS 7000

Microprocessor Controlled von Beckman Instruments

4.2.3. Radioimmunoassay

Eppendorf Mischer 5432

Eppendorf Centrifuge 5415

Zählgerät wie 4.2.2.

4.2.4. Sonstiges

Analysenwaage Sartorius 1201 MP 2

Magnetrührer IKA-Combimag RET

ph-Meter: Orion Research, model 601/digital ionalyzer
Schüttelmixer: Heidolph
Vakuumzentrifuge zum Abdampfen: Speed Vac Concentrator
von Savant
Tischrechner: Texas Instruments TI-51-III
ALZET^R osmotische Minipumpen Model 2001 und Model 2ML1
von ALZA Corp.
Mikroliterpipetten: Eppendorf Varipetten
Mikroliterspritzen Hamilton 10 µl/701 N
Millilitermehrfachpipetten: Eppendorf Combipetten
Eppendorf Reaktionsgefäße 3810 (1.5 ml)
Zählgefäße: Beckman Poly Q Vial
Michel Wundklammern

4.3. Tiere

Die Versuchstiere stammten aus dem Institut für Wissenschaftliche Versuchstierzucht, Gelting. Folgende Tiere fanden Verwendung:

Meerschweine (Hartley): weiß, männlich, 350- 450 g (Untersuchungen am isolierten Meerschweinchenileum)

Ratten (Sprague-Dawley): weiß, männlich, 180-200 g (Bindungsstudien am Rattenhirn).

Die Tiere befanden sich vor dem Versuch jeweils mindestens 5 Tage zur Akklimatisierung in geeigneten Räumlichkeiten (Lüftung, konstante Temperatur (25°C), regelmäßiger Tag-/Nachtrhythmus), wo sie Futter und Wasser ad libitum erhielten.

4.4. Methoden

4.4.1. Längsmuskelpräparat des isolierten Meerschweinchenileums

4.4.1.1. Chronische Opioidinfusion

Für die chronische Verabreichung von Opioiden am Tier wurden die osmotischen Minipumpen ALZET^R 2001 bzw. ALZET^R 2ML1 verwendet (Abb. 26). Im Gegensatz zur Injektionsmethode bzw. zur Implantation von Opioidpellets ermöglichen die subkutan implantierten Minipumpen über einen osmotischen Mechanismus die Abgabe einer während der gesamten Infusionsdauer konstanten Menge an gelöstem Opioid in den Körper. Abb. 26 zeigt den Längsschnitt durch eine funktionierende Minipumpe mit der Angabe der wichtigsten technischen Daten. ALZET^R2001 und 2ML1 bestehen aus einer starren, semipermeablen Außenwand (Celluloseester) und einer elastischen, undurchlässigen Innenwand (thermoplastisches Kohlenwasserstoffelastomer); zwischen den beiden Membranen befindet sich ein hypertonisches Medium. Der von der Innenwand umschlossene Raum dient der Aufnahme der Infusionslösung; durch eine Kanüle aus rostfreiem Stahl wird für ein gleichmäßiges Austreten der Flüssigkeit gesorgt. Nach der subkutanen Implantation saugt das hypertone Medium durch die semipermeable Membran Körperflüssigkeit an. Das vergrößerte Volumen zwischen Außen- und Innenwand drückt über die elastische Innenwand den Pumpeninhalt über die Kanüle nach außen. Mit ALZET^R2001 erfolgt eine konstante Infusion von 1 µl/h über etwa 220 Stunden, mit ALZET^R 2ML1 werden 10 µl/h über einen ähnlichen Zeitraum ausgepumpt. Das Modell 2ML1 ist besonders für weniger gut lösliche Substanzen geeignet und wurde für die Infusion von Morphin und Ethylketocyclazocin verwendet. Als Lösungsmittel dienten isotonische Natriumchloridlösung bzw. doppelt de-

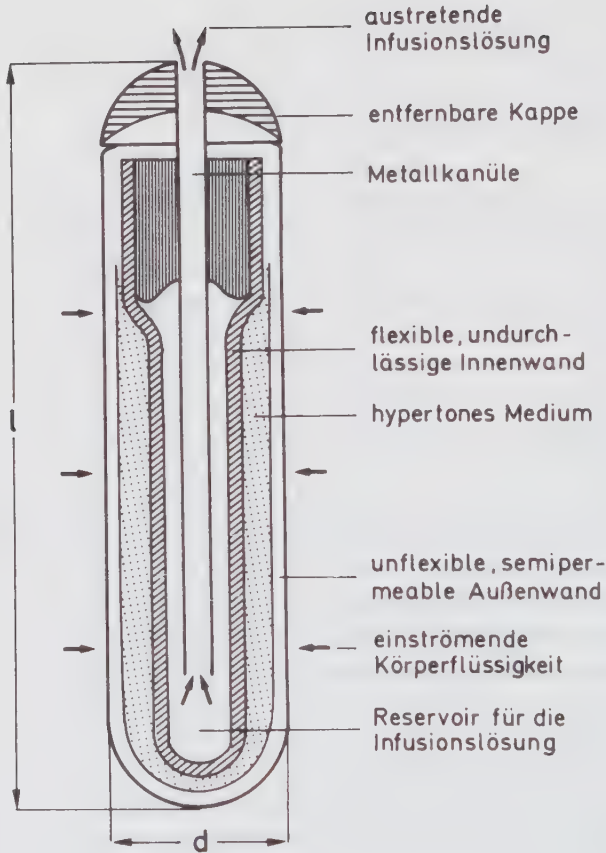


Abb. 26
Längsschnitt durch eine funktionierende Minipumpe
ALZET^R.

Technische Daten:	ALZET ^R 2001	ALZET ^R 2ML1
Durchmesser d (cm)	0.7	1.4
Länge l (cm)	2.5	5.4
Leergewicht (g)	1.1	6
Volumen des Reservoirs (ml)	0.22	2

stilliertes Wasser. Die subkutane Implantation der Pumpen in die Rückenpartie der Tiere wurde unter leichter Ätheranästhesie vorgenommen. Die Wunden wurden durch Michel-Klammern verschlossen. Am 6. Tag nach der Implantation wurden die Tiere dekapitiert.

4.4.1.2. Präparation des Längsmuskels

Nach der Dekapitation des Meerschweinchens und der Öffnung des Abdomens wurde das Ileum von der Ileocaecal-Klappe aus herauspräpariert und in eine Krebs-Ringerlösung übergeführt. Während der gesamten Versuchsdauer blieb der Darm in Gegenwart dieser Nährlösung, die folgendermaßen zusammengesetzt war (Konzentration in mM):

Natriumchlorid (NaCl)	118
Kaliumchlorid (KCl)	4.75
Calciumchlorid (CaCl)	2.54
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	1.19
Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	1.2
Glucose ($\cdot 1\text{H}_2\text{O}$)	11
Cholinhydrochlorid	0.02

Die Präparation des Längsmuskels erfolgte nach der Methode von Rang (1964). Das stets mit Krebs-Ringerlösung befeuchtete Darmstück wurde vom Mesenterium befreit und auf einen Glasstab aufgezogen. Links und rechts entlang des Mesenterialansatzes wurde der aufgezogene Darm mit einem Skalpell eingeschnitten; daraufhin wurde der Längsmuskel mit anhaftendem Plexus myentericus mit Hilfe eines feuchten Wattestäbchens von der darunterliegenden Ringmuskelschicht abgestreift. Das auf diese Weise entstandene Längsmuskelpreparat wurde in 4 cm lange Stücke zerteilt; jedes dieser Einzelstücke wurde an den Enden zu einer Schlaufe gebunden und ins Organbad eingebracht.

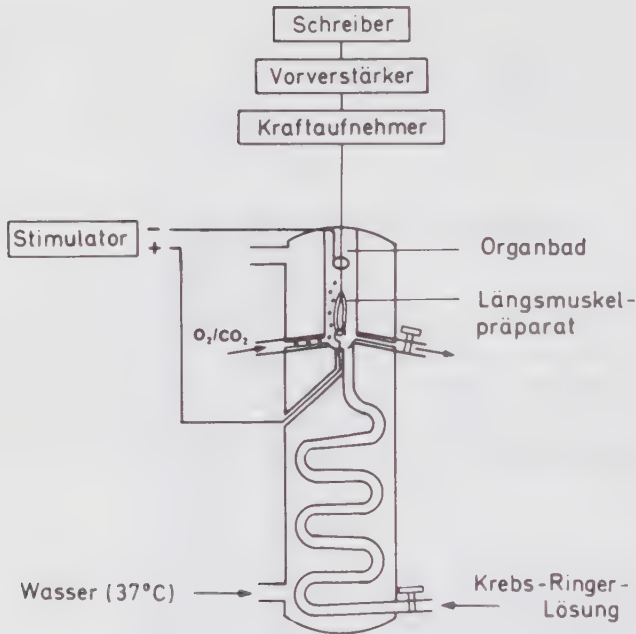


Abb. 27
Versuchsanordnung eines Organbads

4.4.1.3. Versuchsanordnung

Abb. 27 zeigt die Anordnung eines Organbads mit dazugehörenden Geräten. Ein Organbad umfaßt ein Volumen von 5 ml. Die Temperatur der Krebs-Ringerlösung wird durch ein thermostatgeregeltes Wasserbad (37°C) konstant gehalten. Die Begasung des Mediums mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) dient der Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff und trägt zur Stabilisierung des pH-Werts der Lösung (7.4 bis 7.6) bei. Mit Hilfe einer angeschlossenen Wasserstrahlpumpe wird die Nährlösung aus dem Bad abge-

saugt; frische Lösung kann aus einem Reservoir zugeführt werden.

Das zu einer Schlaufe gebundene Präparat wird im Organbad befestigt und durch elektrische Feldstimulation von einem Reizgerät aus stimuliert (0.1 Hz, 0.5 msec, 60 V). Unter diesen Bedingungen erfolgt eine maximale Muskelkontraktion. Die Kontraktionen werden über einen Kraftaufnehmer und einen Vorverstärker auf einen Schreiber übertragen und dort registriert. Nach Einbringen des Präparates wird die Badeflüssigkeit im allgemeinen mindestens 60 Minuten lang im Fünf- bis Zehnminutenintervall erneuert, bis regelmäßige Muskelkontraktionen erreicht sind.

4.4.1.4. Quantifizierung der Opioidwirkung

Grundsätzlich bewirken Opioide eine Reduktion der elektrisch stimulierten Kontraktionen des Meerschweinchenileums (siehe 2.1.1.2.). Als Parameter für die Wirkungsstärke eines Opioids gilt die ED_{50} , d.h. diejenige Konzentration des Opioids, die eine 50%ige Hemmung der elektrisch stimulierten Kontraktion hervorruft.

Mittels Hamiltonspritzen (Volumen maximal 10 μ l) wurden die wäßrigen Opioidlösungen in mikromolaren Konzentrationen ins Bad eingebracht, wobei die Carbogenbegasung für eine rasche Verteilung des Opioids im Medium sorgte. Nachdem die maximale Hemmwirkung durch eine Opioidkonzentration erfolgt war, wurde im Fünf- bis Zehnminutenintervall solange gewaschen, bis die elektrisch induzierten Kontraktionen die ursprüngliche Höhe wieder erreicht hatten. Die erforderliche Auswaschzeit hängt neben der Konzentration des Opioids unter anderem von seiner Affinität und Lipophilie ab. Das hochaffine und lipophile Fentanyl muß - besonders bei hohen

Konzentrationen - lange (15 Minuten bis mehrere Stunden) ausgewaschen werden, während hydrophilere und gegenüber enzymatischem Abbau empfindliche Opioidpeptide wie etwa Dynorphin in relativ kurzer Zeit aus dem Gewebe entfernt werden können.

Aus der Hemmwirkung verschiedener Konzentrationen eines Opioids kann man eine Dosis-Wirkungskurve erstellen, wobei der Prozentsatz der Hemmwirkung linear auf der Ordinate und die molare Konzentration des Opioids logarithmisch auf der Abszisse aufgetragen wird. Für die Bestimmung der ED_{50} eines Opioids wurden mindestens zwei Konzentrationen des Opioids eingesetzt, die eine etwa 40- bzw. 60%ige Hemmung bewirkten. Aus einem solchen Teilstück der Dosis-Wirkungs-Kurve erfolgte die graphische Ermittlung der ED_{50} .

Um bei chronisch exponierten Präparaten eine entzugsbedingte Toleranzverminderung zu verhindern, wurde der Krebs-Ringerlösung eine den in vivo-Bedingungen angeglichene Opioidkonzentration zugesetzt. Die Ermittlung der ED_{50} -Werte erfolgte in Anwesenheit dieser Opioidkonzentration wie oben beschrieben. Im toleranten Zustand verschiebt sich die Dosis-Wirkungs-Kurve für das betroffene Opioid nach rechts, und der ED_{50} -Wert vergrößert sich. Als Maß für den Grad der Toleranz dient der Quotient ED_{50} am toleranten Präparat / ED_{50} am unbehandelten ("naiven") Präparat.

4.4.1.5. Demonstration und Quantifizierung der Abhängigkeit

Chronisch exponierte Präparate wurden im Organbad mit einer opioidhaltigen Krebs-Ringerlösung inkubiert. Nach dem Abschalten der elektrischen Stimulation erfolgte durch den Zusatz von 5 μ M Naloxon die Präzipitation der

Entzugskontraktur (siehe Abb. 3, 2.1.1.4.). Für die Ermittlung des Abhängigkeitsgrads wurde die Höhe der Entzugskontraktur in Bezug zur Höhe der elektrisch stimulierten Kontraktion gesetzt. Bei den unter 2.1.2. und 2.1.3. bzw. 2.1.4. beschriebenen Kreuzabhängigkeitsstudien wurde der Abhängigkeitsgrad als Entzugskontraktur in % folgendermaßen berechnet:

$$\text{Abhängigkeit (\%)} = \frac{\text{Höhe der Entzugskontraktur} \times 100}{\text{Höhe der elektrisch stimulierten Kontraktion vor Reinkubation mit einem Agonisten}}$$

Bei den unter 2.1.5. beschriebenen Versuchen galt:

$$\text{Abhängigkeit (\%)} = \frac{\text{Höhe der Entzugskontraktur} \times 100}{\text{Höhe der elektrisch stimulierten Kontraktion in Anwesenheit eines Agonisten}}$$

4.4.1.6. Bestimmung des K_e -Wertes

Die ED_{50} -Werte von Opioiden wurden - wie unter 4.4.1.4. beschrieben - zunächst in Abwesenheit von Naloxon ermittelt. Bei der Ermittlung der ED_{50} in Gegenwart von Naloxon wurden die Präparate 5 Minuten vor der Zugabe einer Opioiddosis mit 50 nM Naloxon versetzt. Nach der Registrierung der Hemmwirkung wurden der Agonist und Naloxon wieder ausgewaschen. Der K_e -Wert wurde nach folgender Formel errechnet (Kosterlitz und Watt, 1968):

$$K_e = \frac{a}{DR - 1} \quad (M)$$

a = molare Konzentration des Antagonisten

$DR = \frac{ED_{50} \text{ des Opioids in Gegenwart des Antagonisten}}{ED_{50} \text{ des Opioids in Abwesenheit des Antagonisten}}$

4.4.2. Radiorezeptorassay am Rattenhirn

4.4.2.1. Chronische Morphinexposition

Die chronische Zufuhr von Morphin erfolgte über subkutan implantierte Morphinpellets, die nach der Methode von Gibson und Tingstad (1970) hergestellt waren und folgende Bestandteile enthielten (mg):

Morphinbase	75
Silikondioxid	0.75
mikrokristalline Zellulose	75
Calciumstearat	1.5

Die Tiere erhielten innerhalb von 10 Tagen 13 Morphinpellets nach dem Schema von Bläsig et al., 1979:

Tag 1 bis 5: 1 Pellet täglich

Tag 6 bis 9: 2 Pellets täglich.

Die analgetische Dosis-Wirkungskurve (Vokalisations-test) von Morphin flacht unter diesen Bedingungen ab; am Tag der Dekapitation (10. Tag) beträgt die Morphin-konzentration im Rattenhirn durchschnittlich 780 ng pro Gramm Hirn (Bläsig et al., 1979). Die Morphinpellets wurden einzeln unter leichter Ätheranästhesie subkutan in die Rückenregion der Ratten implantiert; die Schnitte wurden mit Michel-Klammern verschlossen.

Die Absorption von Morphin aus den Pellets erfolgt nach einer anfänglich raschen Freisetzung allmählich langsamer und erreicht schließlich ein Plateau, wenn etwa die Hälfte bis zwei Drittel der gesamten Morphinmenge freigesetzt wurden (Bläsig et al., 1973; Gibson und Tingstad, 1970). Dieser Freisetzungsverlauf ist möglicherweise auf die Bildung einer fibrösen Gewebekapsel um das Pellet zurückzuführen; jedoch könnte die Morphin-Absorption auch absinken, wenn das Morphin an der Pelletoberfläche aufgelöst ist und das Morphin im Pelletinneren wegen der Wasserunlöslichkeit der Zellulose - als Füllmittel ein Hauptbestandteil des Pellets -

weniger zugänglich für die Körperflüssigkeit ist (Bläsig et al., 1973).

4.4.2.2. Analyse nach Scatchard

Die Ratten wurden in zwei Gruppen eingeteilt:

1. unbehandelte ("naive") Ratten
2. morphintolerante Ratten.

Von jeder Gruppe wurde ein Teil der Hirne während der gesamten Versuchsdauer mit 2 nM Morphin inkubiert. Nach der Dekapitation der Tiere wurde das Gehirn entnommen, das Cerebellum abgetrennt und das restliche Hirn in einer eisgekühlten Tris-HCl-Pufferlösung (0.05 M, pH 7.4) nach der Potter-Elvehjem-Technik homogenisiert (10 Auf- und Abwärtsbewegungen bei 750 rpm). Mit der Tris-HCl-Lösung wurde auf eine Endkonzentration von 1:100 (g Gewebe/ml Puffer) verdünnt; die Suspension wurde zweimal bei 20.000 UpM 20 Minuten lang zentrifugiert, wobei jedesmal der Überstand verworfen und der Rückstand in Tris-HCl resuspendiert wurde. An die Resuspension schloß sich jeweils eine Equilibriumszeit von 10 Minuten an. 2 ml-Anteile wurden mit einer konstanten Menge an unmarkiertem Morphin (10^{-6} M) und fünf bzw. sechs verschiedenen Konzentrationen des Tracerliganden ^3H -Dihydromorphin (Endkonzentration 0.1 bis 3.2 nM) 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Im Anschluß daran wurde jede Probe unter Vakuum durch Glasfaserfilter (Whatman GF/B, 2.5 cm) abfiltriert und zweimal mit je 4 ml eisgekühltem Tris-HCl-Puffer gespült; auf diese Weise wurde nicht gebundenes Opioid aus dem Gewebe entfernt. Die Filterscheiben wurden mit 7 ml Szintillationsflüssigkeit (Aqualuma Plus) versetzt und 30 Minuten geschüttelt, um das Gewebe aufzulösen. Anschließend erfolgte die Messung der Radioaktivität im Szintillationszähler. Für einen Versuch fand jeweils ein Rattenhirn Verwendung. Für

jede Tracerligandenkonzentration wurden 3 parallele Proben angesetzt; die Ergebnisse der 3 Ansätze wurden gemittelt.

4.4.3. Radioimmunoassay

Mit Hilfe eines Antifentanylantiserums wurde der Fentanylserumgehalt chronisch exponierter Meerschweinchen am Versuchstag bestimmt. Das bei der Dekapitation der Tiere gewonnene Blut wurde zur Gerinnung 60 Minuten unter Eiskühlung aufbewahrt und anschließend 10 Minuten bei 5000 UpM (Eppendorf Zentrifuge) zentrifugiert. Das Serum wurde abpipettiert und bis zum Gebrauch bei -20°C aufbewahrt. Serum aus unbehandelten Meerschweinchen diente als Kontrollserum. Der Radioimmunoassay wurde weitgehend analog des Loperamid-RIAs von Michiels et al. (1977) durchgeführt.

4.4.3.1. Titerbestimmung des Antifentanylantiserums

Es wurden 7 Verdünnungen des Antiserums (1:5000 bis 1:160.000) in Phosphatpuffer (Zusammensetzung: 18 ml NaH_2PO_4 (0.5 M), 82 ml Na_2HPO_4 (0.5 M) in 2500 ml H_2O) mit einem pH-Wert von 7.4 hergestellt. 200- μl -Anteile der Antiserumverdünnungen wurden in doppeltem Ansatz mit 250 μl Puffer und 50 μl ^3H -Fentanyl (0.5 ng in 50 μl 30%iger Methanol-Wassermischung) versetzt und in verschlossenen Eppendorfgefäßen 120 Minuten lang bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurden zur Abtrennung des nicht an Antiserum gebundenen ^3H -Fentanyls 200 μl einer dextranbeschichteten Aktivkohlen suspension (500 mg Norit-A-Aktivkohle, 50 mg Dextran, 100 mg Natriumazid in 100 ml Puffer) zugegeben und weitere 60 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Kohle wurde bei 5000 UpM 10 Minuten lang abzentrifugiert und

der Überstand (80% des Gesamtvolumens = 560 μ l) in Zählgefäße pipetiert und mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit gemischt. Im Szintillationszähler wurde die Radioaktivität ermittelt. Zur graphischen Darstellung der Titerkurve wurden auf der Abszisse logarithmisch die Antiserumverdünnungen und auf der Ordinate die entsprechenden cpm des gebundenen ^3H -Fentanyls aufgetragen (Abb. 28). Für die Serumuntersuchungen wurde schließlich eine Antiserumverdünnung von 1:15000 ausgewählt.

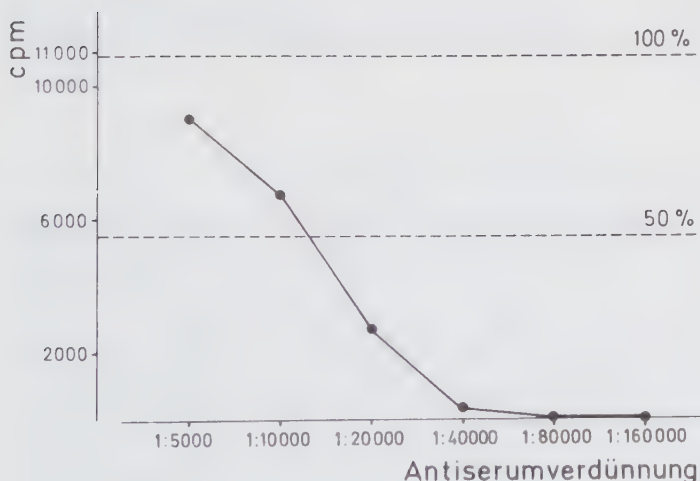


Abb. 28

Titerkurve des Antifentanylantiserums. Ordinate: gebundenes ^3H -Fentanyl (cpm); Abszisse: Antiserumverdünnungen (logarithmischer Maßstab).

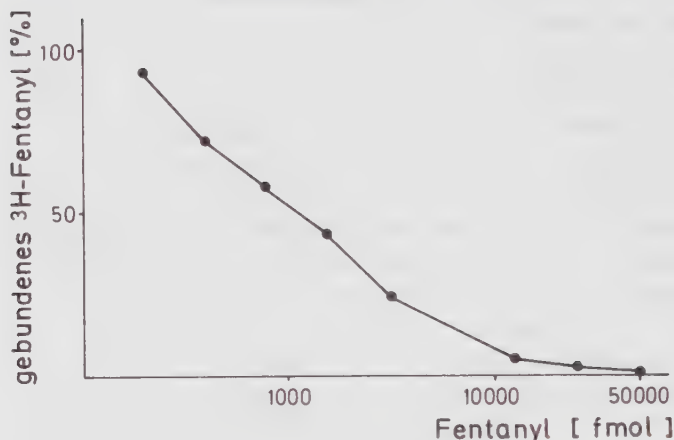


Abb. 29

Standardkurve für Fentanyl. Ordinate: gebundenes ³H-Fentanyl (%); Abszisse: bekannte Verdünnungen nicht radioaktiv markierten Fentanyls (fmol) im logarithmischen Maßstab.

4.4.3.2. Standardkurve für Fentanyl

Für die Erstellung einer Standardkurve wurden 7 Verdünnungen von unmarkiertem Fentanyl (fmol) in Kontrollserum in 250 µl-Anteilen (doppelter Ansatz) mit 200 µl Antiserum (1:15000) und 50 µl ³H-Fentanyl (Konz. wie oben) 120 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Untersuchungsserien wurden mit Kontrollserum 1:5 verdünnt und wie die bekannten Fentanylverdünnungen behandelt. Für die Abtrennung von freiem Fentanyl wurden 200 µl einer höher konzentrierten Kohlesuspension (2 g Norit-A-Aktivkohle, 50 mg Dextran, 100 mg Natriumazid in 100 ml Puffer) zugesetzt und die Mischung weitere 60 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Abtrennung der Kohle und die Ermittlung der Radioaktivität erfolgte wie unter 4.4.3.1. Für die Standardkurve wurden die bekannten Fentanylverdünnungen (fmol) loga-

rithmisch auf der Abszisse, das gebundene ^3H -Fentanyl (cpm) auf der Ordinate aufgetragen (Abb.29). Mit Hilfe dieser Standardkurve wurde der Fentanylgehalt (fmol) der Untersuchungen ermittelt.

4.5. Statistik

Bei den Untersuchungen am Längsmuskelpräparat des Meerschweinchenileums erfolgte die Berechnung der Mittelwerte ($\bar{x}$) aus mindestens 7 Einzelwerten (n) von Präparaten verschiedener Tiere. Die Punkte der Scatchard-Diagramme setzen sich aus mindestens 4 Einzelwerten von verschiedenen Hirnen zusammen, die wiederum die Mittelwerte dreier paralleler Ansätze darstellen.

Zur Berechnung der Streuung wurden die Standardabweichung bzw. der Standardfehler des Mittelwerts (S.E.M.) herangezogen.

Zum Vergleich zweier voneinander unabhängiger Mittelwerte wurde die Signifikanz des Unterschiedes mit Hilfe des "Student's two tailed t-Tests" berechnet; die Wahrscheinlichkeit (p) wurde entsprechenden Tabellen entnommen (Senter, 1969).

Die zum Ausdruck der Beziehung zwischen Toleranz und Abhängigkeit am Meerschweinchenileum ermittelten Kurven wurden durch Best-Fit-Computer-Analyse erhalten.

Die Erstellung der Regressionsgeraden für die Scatchard Plot-Analyse erfolgte nach der Kleinstquadrate-Methode, bei der die Summe der Quadrate der Abweichungen der tatsächlichen Datenpunkte von der besten Anpassung ein Minimum beträgt. Der berechnete Korrelationskoeffizient (r) lag jeweils über 0.9.

4.6. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ACh	Acetylcholin
ANE	α -Neo-Endorphin
B _{max}	maximale Bindungskapazität
β -CNA	β -Chlornaltrexamin
β -FNA	β -Funaltrexamin
cAMP	zyklisches Adenosin-3',4'-monophosphat
Ci	Curie
cpm	counts per minute (gemessene radioaktive Zerfälle pro Minute)
DYN A	Dynorphin A
ED ₅₀	Konzentration eines Opioids, bei der die halbmaximale Hemmung der elektrisch stimulierten Kontraktionen des Längsmuskelpräparates erreicht wird
EKC	Ethylketocyclazocin
FEN	Fentanyl
fmol	Femtomol
GPI	Guinea-pig ileum (Meerschweinchenileum)
h	Stunde
HCl	Salzsäure
³ H-DHM	³ H-Dihydromorphin
Hz	Hertz
K _d	Dissoziationskonstante
K _e	Gleichgewichtskonstante
mM	millimolar
mmol	Millimol
msec	Millisekunden
μ g	Mikrogramm

μ l	Mikroliter
MOR	Morphin
MRZ 2549	(-)-(1R,5R,9R,29``)-5,9-Dimethyl-2`-hydroxy-2-(2-methoxypropyl)-6,7-benzomorphan
nM	nanomolar
NORM	Normorphin
p	probability (Wahrscheinlichkeit)
pA_2	der negative Logarithmus jener Antagonisten-Konzentration, in deren Gegenwart die Agonisten-Konzentration verdoppelt werden muß, um wieder 50% der maximalen Wirkungsstärke zu erreichen
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H^+ -Ionenkonzentration
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
S.E.M.	Standard Error of the Mean (Standardfehler des Mittelwertes)
SP	Substanz P
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U-50,488	trans-3,4-Dichloro-N-methyl-N-[2-(1-pyrrolidinyl)-cyclohexyl]-phenylacetamid
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt

Literaturverzeichnis

- Adam-Vizi, V., Vizi, E.S. (1978): Direct evidence of acetylcholine releasing effect of serotonin in the Auerbach plexus. *J. Neural Transmission* 42, 127-138
- Bardo, M.T., Bhatnagar, R.K., Gebhard, G.F. (1983): Chronic naltrexone increases opiate binding in brain and produces supersensitivity to morphine in the locus coeruleus of the rat. *Brain Res.* 289, 223-234
- Beckett, A.H., Casy, A.F. (1954): Synthetic analgesics: stereochemical considerations. *J. Pharm. Pharmacol.* 6, 986-1001
- Bennett, J.P. jun. (1978): Methods in binding studies. In: Neurotransmitter receptor binding, herausgegeben von Yamamura, Enna und Kuhar. Raven Press, New York, 57-90
- Bläsig, J., Herz, A., Reinhold, K., Zieglgänsberger, S. (1973): Development of physical dependence on morphine in respect to time and dosage and quantification of the precipitated withdrawal syndrome in rats. *Psychopharmacologia* 33, 19-38
- Bläsig, J., Meyer, G., Höllt, V., Hengstenberg, J., Dum, J., Herz, A. (1979): Non-competitive nature of the antagonistic mechanism responsible for tolerance development to opiate-induced analgesia. *Neuropharmacol.* 18, 473-481
- Bockmühl, M., Ehrhardt, G. (1949): Über eine neue Klasse von spasmolytisch und analgetisch wirkenden Verbindungen, I. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* 561, 52-85
- Bowen, W.D., Gentleman, S., Herkenham, M., Pert, C.B. (1981): Interconverting μ and δ forms of the opiate receptor in rat striatal patches. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 4818-4822
- Bradbury, A.F., Smyth, D.G., Snell, C.R. (1976 a): Lipotropin: precursor to two biologically active peptides. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 69, 950-956

- Bradbury, A.F., Smyth, D.G., Snell, C.R., Birdsall, N. J.M., Hulme, E.C. (1976 b): C-fragment of lipotropin has a high affinity for brain opiate receptors. *Nature* 260, 793-795
- Chahl, L.A. (1983): Contracture of guinea-pig ileum on withdrawal of methionine-enkephalin is mediated by substance P. *Brit. J. Pharmacol.* 80, 741-749
- Chang, K.-J. (1984): Opioid peptides have actions on the immune system. *Trends in Neurosci.* 7, 234-235
- Chang, K.-J., Eckel, R.W., Blanchard, S.G. (1982): Opioid peptides induce reduction of enkephalin receptors in cultured neuroblastoma cells. *Nature* 296, 446-448
- Chang, K.-J., Hazum, E., Cuatrecasas, P. (1981): Novel opiate binding sites selective for benzomorphan drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 4141-4145
- Chavkin, C., Goldstein, A. (1984): Opioid receptor reserve in normal and morphine-tolerant guinea-pig ileum myenteric plexus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 7253-7257
- Chavkin, C., Goldstein, A. (1982): Reduction in opiate receptor reserve in morphine-tolerant guinea pig ilea. *Life Sci.* 31, 1687-1690
- Chavkin, C., James, I.F., Goldstein, A. (1982): Dynorphin is a specific endogenous ligand of the κ opioid receptor. *Science* 215, 413-415
- Christie, M.J., Chesher, G.B. (1982): Physical dependence on physiologically released endogenous opiates. *Life Sci.* 30, 1173-1177
- Chuang, D.-M., Costa, E. (1979): Evidence for internalization of the recognition site of β -adrenergic receptors during subsensitivity induced by (-)-isoproterenol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 3024-3028
- Collier, H.O.J. (1965): A general theory of the genesis of drug dependence by induction of receptors. *Nature* 205, 181-182
- Collier, H.O.J. (1984): Cellular aspects of opioid to-

- lerance and dependence. In: Opioids, past, present and future, herausgegeben von J. Hughes, H.O.J. Collier, M.J. Rance und M.B. Tyers. Taylor and Francis, London, Philadelphia, 109-125
- Collier, H.O.J. (1980): Cellular site of opiate dependence. *Nature* 283, 625-629
- Collier, H.O.J. (1969): Humoral transmitters, supersensitivity, receptors and dependence. In: Scientific basis of drug dependence, herausgegeben von H. Steinberg, Churchill, London, 49-66
- Collier, H.O.J. (1968): Supersensitivity and dependence. *Nature* 220, 228-231
- Collier, H.O.J. (1966): Tolerance, physical dependence and receptors. *Advances in Drug Res.* 3, 171-188
- Collier, H.O.J., Cuthbert, N.J., Francis, D.L. (1981): Clonidine dependence in the guinea-pig isolated ileum. *Brit. J. Pharmac.* 73, 443-453
- Collier, H.O.J., Francis, D.L. (1978): A pharmacological analysis of opiate tolerance/dependence. In: The bases of addiction, herausgegeben von J. Fishman. Berlin, Dahlem Konf., 281-298
- Collier, H.O.J., Francis, D.L. (1975): Morphine abstinence is associated with increased brain cyclic AMP. *Nature* 249, 471-473
- Collier, H.O.J., Francis, D.L., Henderson, G., Schneider, C. (1974): Quasi morphine-abstinence syndrome. *Nature* 249, 471-473
- Collier, H.O.J., Francis, D.L., McDonald-Gibson, W.J., Roy, A.C., Saeed, S.A. (1975): Prostaglandins, cyclic AMP and the mechanism of opiate dependence. *Life Sci.* 17, 85-90
- Collier, H.O.J., Roy, A.C. (1974): Morphine-like drugs inhibit the stimulation by E prostaglandins of cyclic AMP formation by rat brain homogenate. *Nature* 248, 24-27
- Collier, H.O.J., Tucker, J.F. (1983): Novel form of drug-dependence - on adenosine in guinea pig ileum.

- Nature 302, 618-621
- Coper, H. (1983): Psychopharmaka -Pharmakotherapie von Psychosen und psychoreaktiven Störungen. In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, herausgegeben von W. Forth, D. Henschler, W. Rummel. 4., völlig neu bearbeitete Auflage, Bibliographisches Institut Mannheim/Wien/Zürich, B.I.-Wissenschaftsverlag, 494-513
- Costa, M., Cuello, C., Furness, J.B., Franco, R. (1980): Distribution of enteric neurons showing immunoreactivity for substance P in the guinea-pig ileum. Neurosci. 5, 323-331
- Costa, M., Furness, J.B. (1979): The sites of action of 5-hydroxytryptamine in nerve-muscle preparations from the guinea-pig small intestine and colon. Brit. J. Pharmacol. 65, 237-248
- Cox, B.M. (1978): Multiple mechanisms in opiate tolerance. In: Characteristics and functions of opioids, herausgegeben von Van Ree u. Terenius. Elsevier/North-Holland Biochemical Press, Amsterdam, 13-23
- Cox, B.M., Goldstein, A., Choh Hao Li (1976): Opioid activity of a peptide, β -lipotropin (61-91), derived from β -lipotropin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 1821- 1823
- Cox, B.M., Padhya, R. (1977): Opiate binding and effect in ileum preparations from normal and morphine pretreated guinea-pigs. Brit. J. Pharmacol. 61, 271-278
- Cox, B.M., Weinstock, M. (1966): The effect of analgesic drugs on the release of acetylcholine from electrically stimulated guinea-pig ileum. Brit. J. Pharmacol. Chemother. 27, 81-92
- Creese, I., Snyder, S.H. (1975): Receptor binding and pharmacological activity of opiates in the guinea-pig intestine. J. Pharmacol. Exp. Ther. 194, 205-219
- Davis, M.E., Akera, T., Brody, T.M. (1979): Reduction of opiate binding to brain stem slices associated with the development of tolerance to morphine in

- rats. J. Pharmacol. Exp. Ther. 211, 112-119
- De Meyts, P., Roth, J., Neville, D.M., Gavin, J.R., Lesniak, M.A. (1973): Insulin interactions with its receptors: experimental evidence for negative co-operativity. Biochem. Biophys. Res. Comm. 55, 154-161
- Dewey, W.L., Chau-Pham, Th.T. (1976): Stereospecific binding of dihydromorphine in various regions of brain in morphine dependent and withdrawn rats. In: Opiates and endogenous opioid peptides, herausgegeben von H.W. Kosterlitz. Elsevier/North-Holland Bio-medical Press, Amsterdam, 403-406
- Dingledine, R., Goldstein, A. (1976): Effect of synaptic transmission blockade on morphine action in the guinea-pig myenteric plexus. J. Pharmacol. Exp. Ther. 196, 97-106
- Dingledine, R., Goldstein, A. (1975): Single Neuron studies of opiate action in the guinea-pig myenteric plexus. Life Sci. 17, 57-62
- Dum, J., Bläsig, J., Meyer, G., Herz, A. (1979): Opiate antagonist-receptor interaction unchanged by acute or chronic opiate treatment. Eur. J. Pharmacol. 55, 375-383
- Ehrenpreis, S., Light, I., Schönbusch, G.H. (1972): Use of the electrically stimulated guinea-pig ileum to study potent analgesics. In: Drug addiction: experimental pharmacology, herausgegeben von J.M. Singh, C.H. Miller, H. Lal. Futura Pub. Co., Mount Kisco, New York, 319-342
- Eisenberg, R.M. (1982 a): Further studies on the acute dependence produces by morphine in opiate naive rats. Life Sci. 31, 1531-1540
- Eisenberg, R.M. (1982 b): Short-term tolerance to morphine: effects of diazepam, phenobarbital, and amphetamine. Life Sci. 30, 1615-1623
- Eisleb, O., Schaumann, O. (1939): Dolantin, ein neuartiges Spasmolytikum und Analgetikum (Chemisches und

- Pharmakologisches). Dt. Medizin. Wochenschrift 65, 967- 968
- Francis, D.L., Roy, A.C., Collier, H.O.J. (1975): Morphine abstinence and quasi-abstinence effects after phosphodiesterase inhibitors and naloxone. Life Sci. 16, 1901-1906
- Gates, M., Tschudi, G. (1956): The synthesis of morphine. J. Amer. Chem. Soc. 78, 1380-1393
- Gibson, R.D., Tingstad, J.E. (1970): Formulation of a morphine implantation pellet suitable for tolerance - physical dependence studies in mice. J. Pharmaceut. Sci. 59, 426-427
- Gilbert, P.E., Martin, W.R. (1976): The effects of morphine- and nalorphine-like drugs in the non-dependent, morphine-dependent and cyclazocine-dependent chronic spinal dog. J. Pharmacol. Exp. Ther. 198, 66- 82
- Gillan, M.G.C., Kosterlitz, H.W. (1982): Spectrum of the μ -, δ - and κ -binding sites in homogenates of rat brain. Brit. J. Pharmacol. 77, 461-469
- Gillan, M.G.C., Kosterlitz, H.W., Robson, L.E., Waterfield, A.A. (1979): The inhibitory effects of pre-synaptic α -adrenoceptor agonists on concentrations of guinea-pig ileum and mouse vas deferens in the morphine-dependent and withdrawn states produced in vitro. Brit. J. Pharmacol. 66, 601-608
- Gintzler, A.R. (1979): Serotonin participation in gut withdrawal from opiates. J. Pharmacol. Exp. Ther. 211, 7-12
- Gintzler, A.R. (1980). Substance P involvement in the expression of gut dependence in opiates. Brain Res. 182, 224-228
- Goldstein, A. (1974): Tolerance and physical dependence in the central nervous system. In: Principles of drug action, herausgegeben von A. Goldstein, L. Aronow, S.M. Kalman. John Wiley and Sons, New York, 586-615

- Goldstein, A., Fischli, W., Lowney, L.I., Hunkapiller, M., Hood, L. (1981): Porcine pituitary dynorphin: complete amino acid sequence of the biologically active heptadecapeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 7219-7223
- Goldstein, A., Goldstein, D.B. (1968): Enzyme expansion theory of drug tolerance and physical dependence. *Proc. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.* 46, 265-267
- Goldstein, D.B., Goldstein, A. (1961): Possible role of enzyme inhibition and repression in drug tolerance and addiction. *Biochem. Pharmacol.* 8, 48
- Goldstein, A., Schulz, R. (1973): Morphine-tolerant longitudinal muscle strip from guinea-pig ileum. *Brit. J. Pharmacol.* 48, 655-666
- Gulland, J.M., Robinson, R. (1925): The constitution of codeine and thebaine. *Memoirs of the Proceedings of the Manchester Literary and Philosophical Society* 1924-1925, 69, 79-86
- Gyang, E.A., Kosterlitz, H.W. (1966): Agonist and antagonist actions of morphine-like drugs on the guinea-pig isolated ileum. *Brit. J. Pharmacol. Chemother.* 27, 514- 527
- Hammond, M.D., Schneider, C., Collier, H.O.J. (1976): Induction of opiate tolerance in isolated guinea-pig ileum and its modification by drugs. In: *Opiates and endogenous opioid peptides, herausgegeben von H.W. Kosterlitz*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 169-176
- Hano, K., Kaneto, H., Kakunaga, T. (1963): Pharmacological studies on analgesics - report 5: development of physical dependence in morphinized mice. *Japan. J. Pharmacol.* 13, 207-214
- Hazum, E., Chang, K.-J., Cuatrecasas, P. (1980): Cluster formation of opiate (enkephalin) receptors in neuroblastoma cells: differences between agonists and antagonists and possible relationships to biolo-

- gical functions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3038-3040
- Herz, A. (1984 a): Multiple endorphins as natural ligands of multiple opioid receptors. In: Central and peripheral endorphins: basic and clinical aspects, herausgegeben von E.E. Müller und A.R. Genazzani. Raven Press, New York, 43-52
- Herz, A. (1984 b): Multiple opioid receptors. In: Opioid modulation of endocrine function, herausgegeben von G. Delitala et al. Raven Press, New York, 11-19
- Hess, R., Herz, A., Friedel, K. (1971): Pharmacokinetics of fentanyl in rabbits in view of the importance for limiting the effect. J. Pharmacol. Exp. Ther. 179, 474-484
- Himmelsbach, C.K. (1943): With reference to physical dependence (Symposium: can the euphoric, analgesic and physical dependence effects of drugs be separated?). Federation Proc. 2, 201-203
- Höllt, V., Dum, J., Bläsing, J., Schubert, P., Herz, A. (1975): Comparison of in vivo parameters of opiate receptor binding in naive and tolerant/dependent rodents. Life Sci. 16, 1823-1828
- Holzer, P., Lippe, I.Th., Barthó, L., Lembeck, F. (1983): (D-met, pro)-enkephalinamide and dynorphin-(1-13) inhibit the cholinergic contraction induced in the guinea-pig ileum by substance P. Eur. J. Pharmacol. 91, 83-88
- Hughes, J., Smith, T.W., Kosterlitz, H.W., Fothergill, L.A., Morgan, B.A., Morris, H.R. (1975): Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. Nature 258, 577-579
- Jaffe, J.H., Sharpless, S.K. (1968): Pharmacological denervation supersensitivity in the central nervous system: a theory of physical dependence. Proc. Assoc. Res. Nerv. Dis. 46, 226-246

- Jurna, I. (1983): Analgetika - Schmerzbekämpfung. In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, herausgegeben von W. Forth, D. Henschler, W. Rummel. 4., völlig neu bearbeitete Auflage, Bibliographisches Institut Mannheim/Wien/Zürich, B.I.-Wissenschaftsverlag, 470-491
- Kakidani, H., Furutani, Y., Takahashi, H., Noda, M., Morimoto, Y., Hirose, T., Asai, M. Inayama, S., Nakanishi, S., Numa, S. (1982): Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine β -neo-endorphin/dynorphin precursor. *Nature* 298, 245-249
- Kitabgi, P., Freychet, P. (1979): Neurotensin contracts the guinea-pig longitudinal ileal smooth muscle by inducing acetylcholine release. *Eur. J. Pharmacol.* 56, 403-405
- Koski, G., Simonds, W.F., Klee, W.A. (1981): Guanine nucleotides inhibit binding of agonists and antagonists to soluble opiate receptors. *J. Biol. Chem.* 256, 15361-1538
- Kosterlitz, H.W., Lyndon, R.J., Watt, A.J. (1970): The effects of adrenaline, noradrenaline and isoprenaline on inhibitory α - and β -adrenoceptors in the longitudinal muscle of the guinea-pig ileum. *Brit. J. Pharmacol.* 39, 398-413
- Kosterlitz, H.W., Paterson, S.J., Robson, L.E. (1981): Characterization of the κ -subtype of the opiate receptor in the guinea-pig brain. *Brit. J. Pharmacol.* 73, 939-949
- Kosterlitz, H.W., Waterfield, A.A. (1975): In vitro models in the study of structure-activity relationships of narcotic analgesics. *Ann. Rev. Pharmacol.*, 29-47
- Kosterlitz, H.W., Watt, A.J. (1968): Kinetic parameters of narcotic agonists and antagonists, with particular reference to N-allylnoroxymorphone (naloxone). *Brit. J. Pharmacol. Chemother.* 33, 266-276

- Kromer, W., Höllt, V., Schmidt, H., Herz, A. (1981): Release of immunoreactive dynorphin from the isolated guinea-pig small intestine is reduced during peristaltic activity. *Neurosci. Lett.* 25, 53-56
- Kuhar, M.J., Pert, C.B., Snyder, S.H. (1973): Regional distribution of opiate receptor binding in monkey and human brain. *Nature* 245, 447-450
- Laurent, A. (1847): Sur la composition des alcalis organiques et de quelques combinaisons azotées. *Ann. Chim. Phys.* 19, 359-377
- Law, P.Y., Hom, D.S., Loh, H.H. (1982): Loss of opiate receptor activity in neuroblastoma x glioma NG 108-15 hybrid cells after chronic opiate treatment. *Mol. Pharmacol.* 22, 1-4
- Leslie, F.M., Chavkin, C., Cox, B.M. (1980): Opioid binding properties of brain and peripheral tissues: evidence for heterogeneity in opioid ligand binding sites. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 214, 395-402
- Leslie, F.M., Kosterlitz, H.W. (1979): Comparison of binding of (³H)-methionine-enkephalin, (³H)-naltrexone and (³H)-dihydromorphine in the mouse vas deferens and brain of the guinea pig. *Eur. J. Pharmacol.* 56, 379-383
- Lewenstein, M.J., Fishman, J. (1966): U.S. Patent 3,254,088
- Linnoila, R.I., Diaugustine, R.P., Miller, R.J., Chang, K.-J., Cuatrecasas, P. (1978): An immunohistochemical and radioimmunological study of the distribution of (Met⁵)- and (Leu⁵)-enkephalin in the gastrointestinal tract. *Neurosci.* 3, 1187-1196
- Lord, J.A.H., Waterfield, A.A., Hughes, J., Kosterlitz, H.W. (1968): Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature* 267, 495-499
- Madden, J.S. (1979): Opioids and general sedatives. In: A guide to alcohol and drug dependence, von J.S. Madden. J. Wright & Sons, Bristol, 134-163
- Martin, W.R. (1968): A homeostatic and redundancy

- theory of tolerance to and dependence on narcotic analgesics. Proc. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis. 46, 206-225
- Martin, W.R., Eades, C.G., Thompson, J.A., Huppler, R.E., Gilbert, P.E. (1976): The effects of morphine- and nalorphine-like drugs in the non-dependent and morphine-dependent chronic spinal dog. J. Pharmacol. Exp. Ther. 197, 517-532
- Martin, W.R., Eades, C.G., Thompson, W.O., Thompson, J. A., Flanary, H.G. (1974): Morphine physical dependence in the dog. J. Pharmacol. Exp. Ther. 189, 759-771
- McCawley, E.L., Hart, E.R., Marsh, D.F. (1941): The preparation of N-allylnormorphine. J. Amer. Chem. Soc. 63, 314
- Mehta, C.S., Johnson, W. (1974): Elevation of brain cyclic adenosine 3':5' monophosphate during naloxone precipitated withdrawal in morphine-dependent rats. Fed. Proc. 33, 493
- Michiels, M., Hendriks, R., Heykants, J. (1977): Radio-immunoassay of the antidiarrhoeal loperamide. Life Sci. 21, 451-460
- Nakanishi, S., Inoue, A., Kita, T., Nakamura, M., Chang, A.C.Y., Cohen, S.N., Numa, S. (1979): Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin- β -lipotropin precursor. Nature 278, 423-427
- Netter, F.H. (1958): A compilation of paintings on the normal and pathologic anatomy of the nervous system with a supplement on the hypothalamus. In: The Ciba collection of medical illustrations, Vol. 1, Ciba
- Neumann, H.-G. (1983): Entstehung und Behandlung von Tumoren. In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, herausgegeben von W. Forth, D. Henschler, W. Rummel. 4., völlig neu überarbeitete Auflage, Bibliographisches Institut Mannheim/Wien/Zürich, B.I.-Wissenschaftsverlag, 619-633

- Noda, M., Furutani, Y., Takahashi, H., Toyosato, M., Hirose, T., Inayama, S., Nakanishi, S., Numa, S. (1982): Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin. *Nature* 295, 202-206
- North, R.A., Tonini, M. (1977): The mechanism of action of narcotic analgesics in the guinea-pig ileum. *Brit. J. Pharmacol.* 61, 541-549
- Paton, W.D.M. (1957): The action of morphine and related substances on concentration and on acetylcholine output of coaxially stimulated guinea-pig ileum. *Brit. J. Pharmacol.* 11, 119-127
- Paton, W.D.M. (1955): The response of the guinea-pig ileum to electrical stimulation by coaxial electrodes. *J. Physiol. London* 127, 40-41
- Paton, W.D.M., Vizi, E.S. (1969): The inhibitory action of noradrenaline and adrenaline on acetylcholine output by guinea-pig ileum longitudinal muscle strip. *Brit. J. Pharmacol.* 35, 10-28
- Perry, D.C., Rosenbaum, J.S., Sadee, W. (1982): In vivo binding of ³H-etorphine in morphine-dependent rats. *Life Sci.* 31, 1405-1408
- Pert, C.B., Snyder, S.H. (1973 a): Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science* 179, 1011-1014
- Pert, C.B., Snyder, S.H. (1973 b): Properties of opiate-receptor binding in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 2243-2247
- Pohl, J. (1915): Über das N-Allylnorcodein, einen Antagonisten des Morphins. *Zeitschr. f. Exp. Path. u. Ther.* 17, 370-382
- Portoghese, P.S. (1965): A new concept on the mode of interaction of narcotic analgesics with receptors. *J. Med. Chem.* 8, 609-616
- Portoghese, P.S., Larson, D.L., Jiang, J.B., Caruso, T.P., Takemori, A.E. (1979): Synthesis and pharmacological characterization of an alkylating analogue

- (chlornaltrexamine) of naltrexone with ultralong-lasting narcotic antagonist properties. *J. Med. Chem.* 22, 168-173
- Portoghese, P.S., Larson, D.L., Jiang, J.B., Takemori, A.E., Caruso, T.P. (1978): 6 β -[N,N-bis(2-chloroethyl)amino]-17-(cyclopropylmethyl)-4,5 α -epoxy-3,14-dihydroxymorphinan (chlornaltrexamine), a potent opioid receptor alkylating agent with ultralong narcotic antagonist activity. *J. Med. Chem.* 21, 598-599
- Portoghese, P.S., Larson, D.L., Sayre, L.M., Fries, D. S., Takemori, A.E. (1980): A novel opioid receptor site directed alkylating agent with irreversible narcotic antagonistic and reversible agonistic activities. *J. Med. Chem.* 23, 233-234
- Raff, M. (1976): Self-regulation of membrane receptors. *Nature* 259, 265-266
- Rang, H.P. (1964): Stimulant actions of volatile anaesthetics on smooth muscle. *Brit. J. Pharmacol.* 22, 356-365
- Rodbell, M. (1980): The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. *Nature* 284, 17-22
- Rubini, P., Schulz, R., Wüster, M., Herz, A. (1982): Opiate receptor binding studies in the mouse vas deferens exhibiting tolerance without dependence. *Nauyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 319, 142-146
- Rüegg, U.T., Cuenod, S., Hiller, J.M., Gioannini, T., Howells, R.D., Simon, E.J. (1981): Characterization and partial purification of solubilized active opiate receptors from toad brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 4635-4638
- Rüegg, U.T., Hiller, J.M., Simon, E.J. (1980): Solubilization of an active opiate receptor from *bufo marinus*. *Eur. J. Pharmacol.* 64, 367-368
- Sato, T., Takayanagi, I., Takagi, K. (1974): Effects of acetylcholine releasing drugs on electrical

- activities obtained from Auerbach's plexus in the guinea-pig ileum. Japan. J. Pharmacol. 24, 447-451
- Sato, T., Takayanagi, I., Takagi, K. (1973): Pharmacological properties of electrical activities obtained from neurons in Auerbach's plexus. Japan. J. Pharmacol. 23, 665-671
- Scatchard, G. (1949): The attractions of proteins for small molecules and ions. Ann. N. Y. Acad. Sci. 51, 660-672
- Schaumann, W. (1957): Inhibition by morphine of the release of acetylcholine from the intestine of the guinea-pig. Brit. J. Pharmacol. 12, 115-118
- Schulz, R., Cartwright, C. (1974): Effect of morphine on serotonin release from myenteric plexus of the guinea-pig. J. Pharmacol. Exp. Ther. 190, 420-430
- Schulz, R., Herz, A. (1976 a): Aspects of opiate dependence in the myenteric plexus of the guinea-pig. Life Sci. 19, 1117-1128
- Schulz, R., Herz, A. (1976 b): The guinea-pig ileum as an in vitro model to analyse dependence liability of narcotic drugs. In: Opiates and endogenous opioid peptides, herausgegeben von H.W. Kosterlitz. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 319-327
- Schulz, R., Wüster, M., Herz, A. (1981 a): Pharmacological characterization of the ϵ -opiate receptor. J. Pharmacol. Exp. Ther. 216, 604-606
- Schulz, R., Wüster, M., Herz, A. (1981 b): Selective tolerance to particular types of opiate receptors - a tool in the investigation of the multiplicity of receptors and of mechanisms of tolerance/dependence. Proc. Int. Workshop Neuropharmacol. Taipei, 155-162
- Schulz, R., Wüster, M., Herz, A. (1979): Supersensitivity to opioids following the chronic blockade of endorphin action by naloxone. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 306, 93-96

- Schulz, R., Wüster, M., Krenss, H., Herz, A. (1980 a):
Lack of cross-tolerance on multiple opiate receptors
in the mouse vas deferens. *Mol. Pharmacol.* 18, 395-
401
- Schulz, R., Wüster, M., Krenss, H., Herz, A. (1980 b):
Selective development of tolerance without dependen-
ce in multiple opiate receptors of mouse vas defe-
rence. *Nature* 285, 242-243
- Schulz, R., Wüster, M., Rubini, P., Herz, A. (1981 c):
Functional opiate receptors in the guinea-pig ileum:
their differentiation by means of selective toleran-
ce development. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 219,
547-550
- Senter, R.J. (1969): Analysis of data - introductory
statistics for the behavioural sciences. Scott, Fo-
resman and Company, Glenview, Illinois
- Sharma, S.K., Klee, W.A., Nirenberg, M. (1975 a): Dual
regulation of adenylate cyclase accounts for narco-
tic dependence and tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
USA 72, 3092-3096
- Sharma, S.K., Nirenberg, M., Klee, W.A. (1975 b): Mor-
phine receptors as regulators of adenylate cyclase
activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 590-594
- Shuster, L. (1961): Repression and de-repression of en-
zyme synthesis as a possible explanation of some
aspects of drug actions. *Nature* 189, 314-315
- Simantov, R., Snyder, S.H. (1976): Morphine-like pepti-
des in mammalian brain: isolation, structure eluci-
dation, and interactions with the opiate receptor.
Physiol. 73, 2515-2519
- Simon, E.J., Hiller, J.M. (1978): The opiate receptors.
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 18, 371-394
- Simon, E.J., Hiller, J.M., Edelman, I. (1973): Stereo-
specific binding of the potent narcotic analgesic
[³H]-etorphine to rat-brain homogenate. *Proc. Natl.*
Acad. Sci. USA 70, 1947-1949
- Simonds, W.F., Koski, G., Streaty, R.A., Hjelmeland,

- L.M., Klee, W.A. (1980): Solubilization of active opiate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 4623-4627
- Smythies, J.R. (1977): On the molecular forms of the opiate receptor. *Psychoneuroendocrinol.* 2, 71-72
- Smythies, J.R. (1975): Possible molecular forms of the opiate receptor. *Life Sci.* 16, 1819-1820
- Snyder, S.H. (1975): Opiate receptor in normal and drug altered brain function. *Nature* 257, 185-189
- Strulovici, B., Cerione, R.A., Kilpatrick, B.F., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1984): Direct demonstration of impaired functionality of a purified desensitized β -adrenergic receptor in a reconstituted system. *Science* 225, 837-840
- Takemori, A.E., Larson, D.L. Portoghese, P.S. (1981): The irreversible narcotic antagonistic and reversible agonistic properties of the fumaramate methyl ester derivative of naltrexone. *Eur. J. Pharmacol.* 70, 445-451
- Tang, A.H., Collins, R.J. (1978): Enhanced analgesic effect of morphine after chronic administration of naloxone in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 47, 473-474
- Tempel, A., Gardner, E.L., Zukin, R.S. (1984): Visualization of opiate receptor up-regulation by light microscopy autoradiography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 3893-3897
- Tempel, A., Zukin, R.S., Gardner, E.L. (1982): Super-sensitivity of brain opiate receptor subtypes after chronic naltrexone treatment. *Life Sci.* 31, 1401-1404
- Terenius, L. (1973): Characteristics of the "receptor" for narcotic analgesics in synaptic plasma membrane fraction from rat brain. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 33, 377-384
- Trendelenburg, P. (1917): Physiologische und pharmakologische Versuche über die Dünndarmperistaltik. *Path. Pharmacol.* 81, 55-129

- Tulunay, F.C., Jen, M.-F., Chang, K.-J., Loh, H.H., Lee, N.M. (1981): Possible regulatory role of dynorphin on morphine and δ -endorphin-induced analgesia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 219, 296-298
- VonVoigtlander, P.F., Collins, R.J., Lewis, R.A., Neff, G.L. (1981): U-50,488 (trans-3,4-dichloro-N-methyl-N-[2-(1-pyrrolidinyl)cyclohexyl]-benzenacetamide): prototype for a new class of opioid analgesics. *Pharmacologist* 23, 134
- Ward, S.J., Portoghese, P.S., Takemori, A.E. (1982 a): Improved assays for the assessment of κ - and δ -properties of opioid ligands. *Eur. J. Pharmacol.* 85, 163-170
- Ward, S.J., Portoghese, P.S., Takemori, A.E. (1982 b): Pharmacological profiles of δ -funaltrexamine (δ -FNA) and δ -chlornaltrexamine (δ -CNA) on the mouse vas deferens preparation. *Eur. J. Pharmacol.* 80, 377-384
- Watson, S.J., Akil, H., Khachaturian, H., Young, E., Lewis, M.E. (1984): Opioid systems: anatomical, physiological and clinical perspectives. In: Opioids, past, present, future, herausgegeben von J. Hughes, H.O.J. Collier, M.J. Rance, M.B. Tyers. Taylor & Francis, London and Philadelphia, 145-178
- Way, E.L., Loh, H.H., Shen, F.-H. (1969): Simultaneous quantitative assessment of morphine tolerance and physical dependence. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 167, 1-8
- Wen, H.L., Ho, W.K.K., Wen, P.Y.C. (1984): Comparison of the effectiveness of different opioid peptides in suppressing heroin withdrawal. *Eur. J. Pharmacol.* 100, 155-162
- World Health Organization (1964): WHO expert committee on addiction-producing drugs - thirteenth report. World Health Organization Techn. Rep. Ser. No. 273, Genf
- Wright, C.R.A. (1874): On the action of organic acids and their anhydrides on the natural alkaloids. Part

- I. J. Chem. Soc. 27, 1031-1043
- Wüster, M. (1978): Über den Mechanismus der selektiven Wirkung von synthetischen Antidiarrhoika auf enterale Opiatrezeptoren. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades im Fachbereich Chemie/Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München
- Wüster, M., Costa, T., Gramsch, C. (1983): Uncoupling of receptors is essential for opiate-induced desensitization (tolerance) in neuroblastoma x glioma hybrid cells NG 108-15. Life Sci. 33, Sup. I, 341-344
- Wüster, M., Rubini, P., Schulz, R. (1981 a): The preference of putative pro-enkephalins for different types of opiate receptors. Life Sci. 29, 1219-1227
- Wüster, M., Schulz, R., Herz, A. (1981 b): Commentary: multiple opiate receptors in peripheral tissue preparations. Biochem. Pharmacol. 30, 1883-1887
- Wüster, M., Schulz, R., Herz, A. (1980): The direction of opioid agonists towards μ -, δ - and ϵ -receptors in the vas deferens of the mouse and the rat. Life Sci. 27, 163-170
- Yau, W.H., Youther, M.L. (1982): Direct evidence for a release of acetylcholine from the myenteric plexus of guinea-pig small intestine by substance P. Eur. J. Pharmacol. 81, 665-668
- Zukin, R.S., Sugarman, J.R., Fitz-Syage, M.L., Gardner, E.L., Zukin, S.R., Gintzler, A.R. (1982): Naltrexone-induced opiate receptor supersensitivity. Brain Res. 245, 285-292

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München in der Abteilung Neuropharmakologie durchgeführt.

Die Anregung zu dieser Arbeit erhielt ich von Herrn Prof. Dr. A. Herz, dem ich für seine Unterstützung danke.

Herrn Prof. Dr. R. Schulz danke ich für die Betreuung der Arbeit.

Lebenslauf

24. Dezember 1954 : in Bogen geboren als Tochter
des Kaminkehrermeisters Georg
Seidl und seiner Ehefrau Ele-
onore
- September 1961 bis
Juni 1974 : Besuch der Volksschule in Bo-
gen und Miltach und des Ro-
bert-Schuman-Gymnasiums in
Cham
- Juni 1974 : Abitur
- November 1974 bis
Oktober 1978 : Pharmaziestudium an der
Ludwig-Maximilians-Universität
in München
- Januar 1979 bis
Januar 1980 : Pharmazeutisches Praktikums-
jahr in der Apotheke am Karls-
platz in München
- Februar 1980 : Pharmazeutisches Staatsexamen
- April 1980 bis
April 1981 : als Apothekerin in der Apothe-
ke am Karlsplatz in München
- Mai 1981 bis
September 1983 : Ausführung der vorliegenden
Doktorarbeit unter Anleitung
von Prof. Dr. A. Herz an der
Neuropharmakologischen Abtei-

lung des Max-Planck-Instituts
für Psychiatrie in München

seit Januar 1984

: als Apothekerin in der St. Hed-
wig-Apotheke in München

